(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 796 378**

(51) Int. CI.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2017 PCT/EP2017/050508**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17121771**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2017 E 17700926 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3402820**

(54) Título: **Anticuerpos monoclonales anti-cd47 humanizados, de ratón o químicos**

(30) Prioridad:

11.01.2016 EP 16150808
02.06.2016 EP 16172651

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.11.2020

(73) Titular/es:

FORTY SEVEN, INC. (100.0%)
1490 O'Brien Drive Suite A
Menlo Park, California 94025, US

(72) Inventor/es:

CHÂLONS-COTTAVOZ, MARIE;
LAHMAR, MEHDI;
SCHWAMBORN, KLAUS;
BELTRAMINELLI, NICOLA;
FALLOT, STÉPHANIE y
GARRONE, PIERRE

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales anti-cd47 humanizados, de ratón o químicos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] Se proporcionan anticuerpos monoclonales anti-CD47 humanizados, de ratón o quiméricos. Los anticuerpos se unen al CD47 glicosilado y desglicosilado humano con un valor de Koff optimizado, interrumpen la interacción humana CD47-SIRPα y encuentran uso en varios métodos terapéuticos, preventivos o de diagnóstico. La invención incluye anticuerpos aislados y derivados y fragmentos de los mismos, formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos monoclonales anti-CD47 humanizados o quiméricos; y líneas celulares que producen estos anticuerpos monoclonales. También se proporcionan secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los anticuerpos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los macrófagos eliminan los patógenos y las células dañadas o envejecidas del torrente sanguíneo a través de la fagocitosis. El CD47 de la superficie celular interactúa con su receptor en los macrófagos, SIRPα, para inhibir la fagocitosis de las células normales y sanas. CD47 es una glicoproteína transmembrana ampliamente expresada con un solo dominio similar a Ig y cinco regiones que abarcan la membrana, que funciona como un ligando celular para SIRPα con unión mediada a través del dominio similar a V NH2-terminal de SIRPα. SIRPα se expresa principalmente en células mieloides, incluidos macrófagos, granulocitos, células dendríticas (CD) mieloides, mastocitos y sus precursores, incluidas las células madre hematopoyéticas (CMH).

[0003] SIRPα inhibe la fagocitosis de las células huésped por los macrófagos, donde la ligadura de SIRPα en los macrófagos por CD47 expresada en la célula diana del huésped genera una señal inhibitoria mediada por SHP-1 que regula negativamente la fagocitosis. SIRPα actúa para detectar las señales proporcionadas por "uno mismo", para controlar negativamente la función inmune innata contra estas células.

[0004] De acuerdo con el papel de CD47 para inhibir la fagocitosis de las células normales, existe evidencia de que está regulada por aumento en varios tipos de cáncer. La sobreexpresión de CD47 en una línea celular de cáncer, como por ejemplo la leucemia mieloide, aumenta su patogenicidad al permitirle evadir la fagocitosis. Por lo tanto, la regulación positiva de CD47 es un mecanismo importante que proporciona protección a las CMH normales durante la movilización mediada por inflamación, y que las células cancerígenas cooptan para evadir la matanza de macrófagos.

[0005] WO2014123580 describe anticuerpos CD47 de depleción no plaquetaria y de depleción no de glóbulos rojos y métodos de uso de los mismos.

[0006] WO0148020 describe una composición para la inhibición de actividad de macrofagos.

[0007] La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD47 que muestran diversas características deseables para el tratamiento de una enfermedad como el cáncer en un sujeto, p. ej., un humano.

SUMARIO

[0008] La invención proporciona un anticuerpo anti-CD47 que comprende:

a. una cadena pesada que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NOs: 49-51 (anotación Rabat) o SEQ ID NOs: 52-54 (anotación IMGT) y una cadena ligera que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NO: 55, 152 y 57 (anotación Rabat) o SEQ ID NO: 58, 153 y 60 (anotación IMGT); o

b. una cadena pesada que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NOs: 49-51 (anotación Rabat) o SEQ ID NOs: 52-54 (anotación IMGT) y una cadena ligera que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NO: 55-57 (anotación Rabat) o SEQ ID NO: 58-60 (anotación IMGT).

[0009] La invención también proporciona un anticuerpo anti-CD47 que comprende una cadena pesada que tiene cada una de las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 61-63 (anotación Rabat) o SEQ ID NO: 64-66 (anotación IMGT) y una cadena ligera que tiene cada una de las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 67-69 (anotación Rabat) o SEQ ID NO: 70-72 (anotación IMGT).

[0010] La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención, que opcionalmente comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0011] La invención también proporciona un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la invención.

[0012] La invención también proporciona una célula que produce un anticuerpo de la invención.

[0013] La invención también proporciona un proceso para producir un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar una célula de la invención para que se exprese un polinucleótido de la invención, y opcionalmente recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

[0014] En un aspecto, el anticuerpo de la invención se une a CD47 glicosilado y no glicosilado, en donde la unión del anticuerpo a CD47 no depende de la glicosilación de CD47. En una realización, el anticuerpo se une a formas glicosiladas y desglicosiladas de CD47 humano. En otra realización, la forma glicosilada de CD47 humano comprende uno o más residuos N-glicosilados en las posiciones N23, N34, N50, N73, N111 y/o N206 en la secuencia de aminoácidos de CD47 humano. La forma desglicosilada de CD47 humano puede comprender CD47 humano glicosilado que ha sido tratado con un péptido N-glucosidasa (PNGasa) para la eliminación de N-glucosilaciones.

[0015] En una realización, una proporción de CE_{50} de unión del anticuerpo a formas no glicosilados versus formas glicosiladas de CD47 es menor que 4:1, 3:1 o 2:1, preferiblemente en un intervalo de 4:1 a 1:4, más preferiblemente 3:1 a 1:3, lo más preferiblemente 2:1 a 1:2; o una proporción de CE95 de unión del anticuerpo a formas no glicosilados versus formas glicosiladas de CD47 es menor que 25:1, 20:1 o 10:1, preferiblemente en un intervalo de 10:1 a 1:10, más preferiblemente 9:1 a 1:9, lo más preferiblemente 10:1 a 1:10.

[0016] En otra realización, el anticuerpo se une a cada CD47 glicosilado y no glicosilado con una constante de unión de equilibrio de 80 pm o inferior, preferiblemente 70 pm o inferior, más preferiblemente 60 pm o inferior.

[0017] En otra realización, una capacidad de unión máxima ($Bmax_2$) del anticuerpo contra CD47 no glicosilado es al menos el 60% de una capacidad de unión máxima ($Bmax_1$) del anticuerpo contra CD47 glicosilado.

[0018] Preferiblemente, el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a CD47 glicosilado y/o no glicosilado de aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ (1/s) o más. Más preferiblemente, el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a CD47 glicosilado y/o no glicosilado de $1,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$. Lo más preferiblemente, el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a CD47 glicosilado y/o no glicosilado de $2,5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $5,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$.

[0019] En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une a CD47, en donde el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a CD47 de $1,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$.

[0020] Se proporcionan composiciones y métodos relacionados con anticuerpos monoclonales anti-CD47 humanizados o quiméricos. Los anticuerpos de la invención se unen a CD47 y tienen un perfil funcional único. En particular, dichos anticuerpos tienen al menos una de las siguientes características: interrumpen la interacción humana CD47-SIRPα, inhiben la transducción de señal CD47-SIRPα, aumentan la fagocitosis de ciertas células que expresan CD47, no causan un nivel significativo de aglutinación de las células y encuentran uso en varios métodos terapéuticos. Se prefieren los anticuerpos que se unen al CD47 humano y que están en el formato IgG4. Se prefieren los anticuerpos en el formato biespecífico que se unen al CD47 humano también pueden estar en el formato IgG1. Se prefieren los anticuerpos no activadores con altos valores de Koff (lo que sugiere una cinética de disociación rápida) y perfiles de apoptosis débiles o ausentes y actividad de aglutinación de glóbulos rojos (lo que sugiere baja toxicidad). Además, se prefieren los anticuerpos que se unen a CD47 humano de diferente patrón de glicosilación y/o a formas desglicosiladas de CD47 humano. Las realizaciones de la invención incluyen anticuerpos aislados y derivados y fragmentos de los mismos, formulaciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los anticuerpos monoclonales anti-CD47 humanizados o quiméricos; y líneas celulares que producen estos anticuerpos monoclonales. También se proporcionan secuencias de aminoácidos y nucleótidos de los anticuerpos.

[0021] Los anticuerpos de interés incluyen los anticuerpos humanizados, diseñados o quiméricos proporcionados, y sus variantes. Los anticuerpos monoclonales de la invención encuentran una utilidad particular como reactivos para el diagnóstico y la inmunoterapia de enfermedades asociadas con CD47 en humanos, particularmente en la terapia contra el cáncer tal como tumores hematológicos y sólidos. Una ventaja de los anticuerpos monoclonales de la invención deriva del proceso de humanización. Por lo tanto, el uso *in vivo* de los anticuerpos monoclonales de la invención para inmunoterapia reduce en gran medida el problema de las respuestas inmunitarias significativas del huésped a los anticuerpos.

[0022] Se contemplan diversas formas de los anticuerpos en este documento. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD47 puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado de longitud completa, p. ej., que tiene una región constante de inmunoglobulina humana de cualquier isotipo, p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, etc., o un fragmento de anticuerpo, p. ej., un anticuerpo de cadena sencilla, un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento F(ab), etc. Los fragmentos que comprenden regiones CDR también son de interés, p. ej., para propósitos de imagen, aunque el formato IgG4 es una forma claramente preferida. Para un enfoque bi-específico, el formato IgG1 también puede ser adecuado. Además, el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse en una fase sólida y/o conjugarse con un compuesto heterólogo. El anticuerpo también puede proporcionarse como un anticuerpo biespecífico o multiespecífico reactivo con un segundo antígeno, que incluye particularmente antígenos de cáncer. Un anticuerpo bi-específico

preferido es un anticuerpo que es funcionalmente reactivo con el antígeno Her-2. Los anticuerpos biespecíficos de uso preferido son aquellos con un medio que se une al CD47 humano tal como, p. ej., el candidato 20 y 22 y sus variantes (p. ej., la versión humanizada del mismo).

[0023] Se contemplan usos diagnósticos y terapéuticos para el anticuerpo, particularmente en relación con la detección y eliminación de células indeseables que expresan CD47. En una aplicación de diagnóstico, la invención proporciona un método para determinar la presencia de células cancerígenas que expresan CD47, que comprende exponer una muestra de paciente sospechosa de contener células cancerígenas que expresan CD47 al anticuerpo anti-CD47 y determinar la unión del anticuerpo a la muestra. Para este uso, la invención proporciona un kit que comprende el anticuerpo e instrucciones para usar el anticuerpo.

[0024] Los anticuerpos de la invención son particularmente eficaces en el tratamiento de enfermedades, p. ej., aumentando la fagocitosis de las células que expresan CD47. El tratamiento puede ser sistémico o localizado, p. ej., administración por inyección intratumoral, etc.

[0025] Las realizaciones de la invención incluyen anticuerpos aislados y derivados y fragmentos de los mismos que comprenden al menos 3 secuencias de CDR como se proporciona en el presente documento, habitualmente en combinación con secuencias marco de una región variable humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo comprende al menos una cadena ligera que comprende las 3 secuencias CDR de cadena ligera proporcionadas en el presente documento situadas en un marco de región variable, que puede ser, sin limitación, un marco de región variable humano o de ratón, y al menos una cadena pesada que comprende 3 secuencias de CDR de cadena pesada proporcionadas en el presente documento situadas en un marco de región variable, que puede ser, sin limitación, un marco de región variable humano o de ratón.

[0026] En otras realizaciones, el anticuerpo comprende una variante de secuencia de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos proporcionados, cuya variante comprende una o más inserciones de aminoácidos dentro o adyacentes a un residuo y/o deleción de CDR dentro o adyacentes a un residuo CDR y/o sustitución(es) de residuo(s) CDR (siendo la(s) sustitución(es) el tipo preferido de alteración de aminoácidos para generar tales variantes). Dichas variantes normalmente tendrán una afinidad de unión para CD47 humano de al menos aproximadamente 10^{-8} M, tal como, p. ej., una afinidad de unión a CD47 humano entre 2 nM a 15 nM, interrumpiendo la interacción humana CD47-SIRPα y se unirán al mismo epítopo como un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de los establecidos en el presente documento. Se contemplan diversas formas de los anticuerpos en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de longitud completa, p. ej., que tiene una región constante de inmunoglobulina humana de cualquier isotipo, p. ej., lgG1 lgG2, lgG3, lgG4, lgA, más preferiblemente lgG4 opcionalmente con mutación(es) o un fragmento de anticuerpo, p. ej., un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento F(ab), etc. Además, el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizado en una fase sólida y/o conjugado con un compuesto heterólogo.

[0027] Las realizaciones de la invención incluyen anticuerpos anti-CD47 (i) con disrupción potente de la interacción humana CD47-SIRPα independientemente del isotipo del anticuerpo (y la función efectora), (ii) permitiendo una fagocitosis eficiente de células tumorales que expresan CD47 por monocitos humanos macrófagos, (iii) con un valor de Koff optimizado de entre 1,0 x 10^{-4} s^{-1} a 1,0 x 10^{-3} s^{-1} (lo que permite un efecto de hundimiento bajo y una mayor disponibilidad de anticuerpos para células cancerígenas portadoras de CD47 de mayor densidad), y/o (iv) que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en modelos de ratón con xenoinjerto que sobreexpresan el CD47 diana. Una realización preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que muestran adicionalmente una débil actividad de aglutinación de glóbulos rojos que sugiere baja toxicidad adicional (candidatos NO 19, 33, 20) y/o no inducen (o solo inducen ligeramente) apoptosis de Células Jurkat (candidatos NO 7, 19, 20, 22, 33). Además, una realización más preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen adicionalmente a CD47 glicosilado y no glicosilado extracelularmente o se unen a un fragmento inmunológicamente activo y glicosilado y no glicosilado del mismo. Además, una realización más preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen al monómero y al dímero de CD47. Además, una realización más preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen a un epítopo particular en CD47, es decir, en particular, un epítopo discontinuo que comprende K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 y T120 de CD47 humano cuando se numera de acuerdo con SEQ ID NO: 151 (p. ej., candidato 20 y versión humanizada y modificada por ingeniería genética del mismo). Otro ejemplo de una realización de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen a un epítopo particular en CD47, es decir, en particular, un epítopo discontinuo que comprende K59, K61, S107, H108, T117, T120 y R121 de CD47 humano cuando se numera de acuerdo con la SEQ ID NO: 151 (p. ej., el candidato 22 y la versión humanizada y modificada de los mismos).

[0028] Las realizaciones de la invención incluyen anticuerpos anti-CD47 (i) con disrupción potente de la interacción humana CD47-SIRPα independientemente del isotipo del anticuerpo (y la función efectora), (ii) que permite la fagocitosis eficiente de las células tumorales que expresan CD47 por monocitos humanos macrófagos, (iii) con un valor de Koff optimizado de entre 1,0 x 10^{-4} s^{-1} a 1,0 x 10^{-3} s^{-1} (lo que permite un bajo efecto de hundimiento y una mayor disponibilidad de anticuerpos para células cancerígenas portadoras de CD47 de mayor densidad), (iv) que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto que sobreexpresan el CD47 diana, y/o (v) y combinaciones de CDR como se establece en las tablas 2 y 3 a continuación, en donde hasta 5, más

preferiblemente hasta 4, 3, 2 o 1 de los aminoácidos en una o más de las CDR se reemplaza por otros aminoácidos como, p. ej., sustituciones conservadoras, en las que, sin embargo, el perfil general del anticuerpo, como los elementos (i) a (iv) anteriores, no cambia o es similar, es decir dentro de un intervalo del 10% de la varianza biológica estándar.

[0029] La invención proporciona además: un ácido nucleico aislado que codifica los anticuerpos y variantes de los mismos; un vector que comprende ese ácido nucleico, opcionalmente unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; una célula huésped que comprende ese vector; un proceso para producir el anticuerpo que comprende cultivar la célula huésped de modo que el ácido nucleico se exprese y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo del cultivo de la célula huésped (p. ej., del medio de cultivo de la célula huésped). La invención también proporciona una composición que comprende uno o más de los anticuerpos anti-CD47 humanos y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Esta composición para uso terapéutico es estéril y puede liofilizarse, p. ej., se proporciona como un preenvase en una dosis unitaria con diluyente y dispositivo de administración, p. ej., inhalador, jeringa, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0030] Los dibujos adjuntos no están destinados a ser dibujados a escala. Las Figuras son solo ilustrativas y no son necesarias para permitir la divulgación. Para fines de claridad, no todos los componentes pueden etiquetarse en cada dibujo. En los dibujos:

Figura 1 Inhibición de la unión de hSIRPα a hCD47 expresada en células CHO por anticuerpos anti-CD47.
Figura 2 Perfiles de unión de anticuerpos anti-CD47 contra hCD47 expresados en células Raji.
Figura 3 Inhibición de la unión de hSIRPα a hCD47 expresada en células Raji por anticuerpos anti-CD47.
Figura 4 Mejora de la fagocitosis de células Raji por macrófagos humanos con anticuerpos anti-CD47.
Figura 5 Aglutinación de glóbulos humanos purificados por anticuerpos anti-CD47.
Figura 6 Perfiles de asociación y disociación de anticuerpos anti-CD47 con hCD47 medidos por SPR.
Figura 7 Las secuencias de aminoácidos de las 5 variantes VH humanizadas (VH1 a VH5) alineadas con la secuencia de la secuencia VH de ratón del candidato 20 (VH0). Las CDR están subrayadas (utilizando la definición combinada de KABAT e IMGT).
Figura 8 Las secuencias de aminoácidos de las 5 variantes VL humanizadas (VL1 a VL5) alineadas con la secuencia de la secuencia VL de ratón del candidato 20 (VL0). Las CDR están subrayadas (utilizando la definición combinada de KABAT e IMGT).
Figura 9 Efecto de los anticuerpos anti-CD47 en A) el crecimiento de células de linfoma Raji humano en ratones NOG y B) supervivencia de ratones NOG después del injerto de células tumorales Raji (*p<0,05; **p<0,005; Prueba de Mantel-Cox).
Figura 10 Efecto del candidato 20 anti-CD47 solo o en combinación con Herceptin® o Erbitux® en el crecimiento de los tumores de ovario A2780/Luc humanos en ratones NOG. Las células A2780/Luc se injertaron por vía intraperitoneal (IP) en ratones NOG (n=4/grupo) y el tratamiento con anticuerpos se inició 1 día después del injerto durante hasta 5 semanas (3 inyecciones/semana, IP) a 10 mg/kg. (A) Luminiscencia ventral y dorsal observada en cada ratón el día 28. (B) Cuantificación de la intensidad de bioluminiscencia (dorsal + ventral) representada frente al tiempo después del injerto tumoral. Los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de vehículos en el día 28 mediante el uso de la prueba t no apareada del software GraphPad Prism (**p<0,005; ***p<0,001).
Figura 11 Efecto del candidato 20 anti-CD47 solo o en combinación con Herceptin® o Erbitux® sobre el crecimiento de células tumorales A549 de pulmón humano en ratones NOG. Las células A549 se injertaron por vía subcutánea en ratones NOG (n=4/grupo) y el tratamiento con anticuerpos se inició cuando el tumor era palpable (día 10) durante hasta 10 semanas (3 inyecciones/semana, IP) a 10 mg/kg. (A) Crecimiento de células tumorales medido por el volumen tumoral medio +/- DE (cm) para cada grupo representado frente al tiempo después del injerto tumoral. Los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de vehículos mediante el método de T/C basado en la velocidad descrito por Hather et al. (Hather G., Liu R., Bandi S., Mettetal J., et al. "Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies". Cancer Informatics 13(S4):65-72 (2014)), (*p<0,05; **p<0,005). (B) Curvas de supervivencia de los ratones. Los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de vehículos utilizando la prueba Log-rank (Mantel-Cox) del software GraphPad Prism (*p<0,05; **p<0,01).
Figura 12 Unión de variantes humanizadas de Candidato 20 anti-CD47 en células Raji por citometría de flujo. Variantes humanizadas con la mutación VL-CDR2-F56Y (CDR2 con SEQ ID Nos: 152 (Kabat) y 153 (IMGT), es decir, candidatos 20,26 (h20-H2-L5Y), 20,27 (h20-H3-L2Y), 20,28 (h20-H3-L3Y), 20,29 (h20-H4-L4Y), 20,30 (h20-H4-L5Y)) se compararon con las variantes correspondientes sin los candidatos de mutación F56Y 20,10 (h20-H2-L5), 20,12 (h20-H3-L2), 20,13 (h20-H3-L3), 20,19 (h20-H4-L4), 20,20 (h20-H4-L5)) y con el candidato quimérico 20 (todos los anticuerpos en formato IgG4 humano).
Figura 13 Inhibición de la unión de hSIRPα a hCD47 en células Raji por variantes humanizadas del candidato 20 anti-CD47. Variantes humanizadas con la mutación VL-CDR2-F56Y (CDR2 con SEQ ID Nos: 152 (Kabat) y 153 (IMGT), es decir, candidatos 20,26 (h20-H2-L5Y), 20,27 (h20-H3-L2Y), 20,28 (h20-H3-L3Y), 20,29 (h20-H4-L4Y), 20,30 (h20-H4-L5Y) se compararon con las correspondientes variantes sin los candidatos de mutación F56Y 20,10 (h20-H2-L5), 20,12 (h20-H3-L2), 20,13 (h20-H3-L3), 20,19 (h20-H4-L4), 20,20 (h20-H4-L5))
Figura 14 Comparación de variantes humanizadas VL-CDR2-F56Y del candidato 20 (es decir, candidatos 20,26 (h20-H2-L5Y), 20,27 (h20-H3-L2Y), 20,28 (h20-H3-L3Y), 20,29 (h20-H4-L4Y), 20,30 (h20-H4-L5Y)) con anticuerpos AB06,12 y Hu5F9 en el ensayo de unión a CD47 y en el ensayo de interacción CD47/SIRPα en células Raji.

Figura 15 Mapeo de epítopos de la interacción entre el candidato 20 y hCD47.
Figura 16 Mapeo de epítopos de la interacción entre el candidato 22 y hCD47.
Figura 17 El análisis del hCD47 soluble por SEC-HPLC mostró heterogeneidad en la preparación de proteínas, con la presencia de monómero y dímero de CD47.
Figura 18 Análisis SDS-PAGE de fracciones de monómero y dímero de hCD47 purificadas, a ~30 kDa y >50 kDa respectivamente.
Figura 19 Reconocimiento del monómero y dímero hCD47 por los candidatos 20 y 22 mediante ELISA de unión.
Figura 20 Liberación de anticuerpos anti-CD47 después de la unión a los glóbulos rojos. Los glóbulos rojos humanos se tiñeron primero con 1 µg/ml de candidatos anti-CD47 de ratón 14, 19, 20, 22 o con el anticuerpo 2A1 o B6H12 de ratón a +4°C. Después del lavado, los glóbulos rojos se incubaron durante 6 horas (T+6 h) o durante 24 horas (T+24 h) a +37°C en medio libre de anticuerpos, y los niveles residuales de anticuerpos anti-CD47 de ratón fijados en los glóbulos rojos se revelaron con un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con PE y citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el % de disminución de la intensidad de fluorescencia media (IFM) medida a T+6h o T+24h en los glóbulos rojos teñidos con un anticuerpo anti-CD47 en comparación con el IFM obtenido para la tinción de los glóbulos rojos con el mismo anticuerpo antes de las incubaciones de 6 y 24 horas (T0).
Figura 21 Liberación de anticuerpos anti-CD47 después de unirse a las células Raji y disminución de la fagocitosis de las células tumorales Raji después de su tinción con anticuerpos anti-CD47. (A) Las células de linfoma de Raji se tiñeron primero con 1 µg/ml de candidatos anti-CD47 de ratón 14, 19, 20, 22 o con el anticuerpo 2A1 o B6H12 de ratón. Después del lavado, las células Raji se incubaron durante 24 horas (T+24 h) a +37°C en medio libre de anticuerpos, luego se lavaron y se fijaron con PFA al 4%. Los niveles residuales de anticuerpos anti-CD47 de ratón fijados en células Raji se revelaron luego con un anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con PE y citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el % de disminución de la intensidad de fluorescencia media (IFM) medida a T+24 h en las células teñidas con un anticuerpo anti-CD47 en comparación con el IFM obtenido para la tinción de células Raji fijadas con PFA con el mismo anticuerpo antes de las incubaciones de 24 horas (T0). (B) Las células de linfoma de Raji marcadas con CFSE se tiñeron primero con 0,1 o 1 µg/ml de candidatos de ratón anti-CD47 14, 19, 20, 22 o con anticuerpo de ratón 2A1 o B6H12. Después del lavado, las células Raji se incubaron durante 24 horas (T+24 h) a +37°C en medio libre de anticuerpos, luego se lavaron y se analizaron en un ensayo de fagocitosis mediante citometría de flujo con macrófagos humanos marcados con Far-Red (hMDM). Los resultados se expresaron como el % de disminución de la fagocitosis medida a T+24 h para las células Raji teñidas con un anticuerpo anti-CD47 en comparación con la fagocitosis de las células Raji teñidas con el mismo anticuerpo antes del período de incubación de 24 horas (T0).
Figura 22 Reconocimiento de CD47 glicosilado (A) y N-desglicosilado (B) humano por los candidatos quiméricos 20 y 22, el anticuerpo humanizado h20-H2L5Y y los anticuerpos humanizados Hu5F9 y AB06,12, medidos por ELISA en placas recubiertas con glicosilado o hCD47 N-desglicosilada. Todos los anticuerpos fueron probados en un formato hu-IgG4.
Figura 23 Eficacia del anticuerpo h20-H2L5Y humanizado solo o en combinación con Herceptin® en el modelo de xenoinjerto A549 NSCLC en ratones NOG. Las células A549 se injertaron por vía subcutánea en ratones NOG (n=8 por grupo) y el tratamiento con anticuerpos se inició cuando el tumor tenía aproximadamente 100 mm (día 14) durante hasta 10 semanas. Los anticuerpos se inyectaron IP (3 inyecciones/semana), con h20-H2L5Y inyectaron en un formato de hu-IgG4 (h20-H2L5Y-G4) a 10 mg/kg/dosis y Herceptin® (hu-IgGl) inyectado a 2,5 mg/kg/dosis. Se monitorizó la supervivencia de los ratones y se presentan curvas de supervivencia. Los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de vehículos utilizando la prueba Log-rank (Mantel-Cox) del software GraphPad Prism (*p<0,05; ***p<0,005). La supervivencia de los ratones tratados con la combinación de h20-H2L5Y-G4 y Herceptin aumentó significativamente en comparación con el grupo tratado con Herceptin solo (p<0,01).
Figura 24 Eficacia del anticuerpo humanizado h20-H2L5Y solo o en combinación con Herceptin® en el modelo de xenoinjerto gástrico NCI-N87 en ratones NOG. Las células NCI-N87 (10 x 10^6) se injertaron por vía subcutánea en ratones NOG (n=8 por grupo) y el tratamiento con anticuerpos se inició cuando el tumor tenía aproximadamente 100 mm (día 7) durante hasta 5 semanas. Los anticuerpos se inyectaron IP (3 inyecciones/semana), con h20-H2L5Y inyectaron en un formato de hu-IgG4-S228P-L235E (H20-H2L5Y-G4PE) a 10 mg/kg/dosis y Herceptin® (hu-IgGl) inyectado a 2,5 mg/kg/dosis. El crecimiento de las células tumorales se controló midiendo el volumen del tumor. El volumen tumoral medio (cm) +/- DE de cada grupo se presentó en diferentes momentos hasta que el primer ratón murió o se sacrificó en los grupos respectivos. Los grupos de tratamiento se compararon con el grupo de vehículos utilizando el método T/C basado en la tasa descrito por Hather et al. (Hather G., Liu R., Bandi S., Mettetal J., et al. "Growth Rate Analysis and Efficient Experimental Design for Tumor Xenograft Studies". Cancer Informatics 13(S4):65-72 (2014)), (*p<0,05; ***p<0,0005). El crecimiento de las células tumorales NCI-N87 también se redujo significativamente en el grupo de animales tratados con la combinación de H20-H2L5Y-G4PE más Herceptin®, en comparación con los animales tratados con Herceptin® sola (p<0,05).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0031] La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales que son específicos para CD47. También se describen secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de tales anticuerpos. Los anticuerpos encuentran uso en métodos terapéuticos y de diagnóstico asociados con CD47.

[0032] "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que se debe

prevenir el trastorno.

[0033] "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

[0034] El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (incluidos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., los anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre que exhiban la actividad biológica deseada. Los "anticuerpos" (Abs) y las "inmunoglobulinas" (Igs) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas similares a anticuerpos que carecen de especificidad de antígeno. Los polipéptidos de este último tipo, p. ej., son producidos en niveles bajos por el sistema linfático y en niveles elevados por mielomas.

[0035] Como se usa en esta invención, el término "epítopo" significa cualquier determinante antigénico en un antígeno al que se une el paratopo de un anticuerpo. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas químicamente activas en la superficie, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

[0036] Los "anticuerpos e inmunoglobulinas nativas" son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en el otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Clothia C, Novotny J, Bruccoleri R, Karplus M. "Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains". J. Mol Biol. 186: 651-63 (1985); Novotny J. y Haber E. "Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers". Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82: 4592-96 (1985)).

[0037] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre los anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de lámina β, conectada por tres CDR, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina β. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (para la anotación de KABAT, ver Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, MD (1991) o para la anotación IMGT, ver http://www.imgt.org). Los dominios constantes no están involucrados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

[0038] Las secuencias de CDR de combinaciones ejemplares de cadena pesada y ligera anti-CD47 se exponen en el listado de secuencias, que incluyen SEQ ID NO: 1-120, 152, 153 (ver Tabla 2 y 3, *supra*).

[0039] La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

[0040] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión de antígeno. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y una ligera en asociación estrecha y no covalente. En una especie de Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable de cadena pesada y una de cadena ligera se puede unir covalentemente mediante un conector peptídico flexible de modo que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno,

aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo. Para una revisión de scFv, ver Pluckthun A. Antibodies from Escherichia coli, en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", por Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, vol. 113, págs. 269-315 (1994).

[0041] El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el terminal carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en donde los residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0042] Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir en subclases (isotipos), p. ej., IgGl, IgG2, lgG3, IgG4, IgAl e lgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0043] El "fragmento de anticuerpo" y todas las variantes gramaticales del mismo, como se usan en el presente documento, se definen como una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto, en donde la porción está libre de los dominios constantes de la cadena pesada (es decir, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo) de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; cualquier fragmento de anticuerpo que es un polipéptido que tiene una estructura primaria que consiste en una secuencia ininterrumpida de residuos de aminoácidos contiguos (denominado en el presente documento "fragmento de anticuerpo de cadena sencilla" o "polipéptido de cadena única"), que incluye, entre otros (1) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv) (2) polipéptidos de cadena sencilla que contienen solo un dominio variable de cadena ligera, o un fragmento del mismo que contiene las tres CDR del dominio variable de cadena ligera, sin un resto de cadena pesada asociado y (3) polipéptidos de cadena simple que contienen solo una región variable de cadena pesada, o un fragmento de la misma que contiene los tres CDR de la región variable de la cadena pesada, sin un resto de cadena ligera asociado; y estructuras multiespecíficas o multivalentes formadas a partir de fragmentos de anticuerpos. En un fragmento de anticuerpo que comprende una o más cadenas pesadas, la(s) cadena(s) pesada(s) puede(n) contener cualquier secuencia de dominio constante (p. ej., CH1 en el isotipo IgG) que se encuentra en una región no Fc de un anticuerpo intacto, y/o puede contener cualquier secuencia de región de bisagra encontrada en un anticuerpo intacto, y/o puede contener una secuencia de cremallera de leucina fusionada o situada en la secuencia de región de bisagra o la secuencia de dominio constante de la(s) cadena(s) pesada(s).

[0044] A menos que se indique específicamente lo contrario, el término "conjugado" como se describe y reivindica en el presente documento se define como una molécula heterogénea formada por la unión covalente de uno o más fragmentos de anticuerpo a una o más moléculas de polímero, en donde la molécula heterogénea es soluble en agua, es decir, soluble en fluidos fisiológicos como la sangre, y en donde la molécula heterogénea está libre de cualquier agregado estructurado. Un conjugado de interés es el PEG. En el contexto de la definición anterior, el término "agregado estructurado" se refiere a (1) cualquier agregado de moléculas en solución acuosa que tenga una estructura esferoide o esferoidal, de modo que la molécula heterogénea no esté en una micela u otra estructura de emulsión, y no está anclado a una bicapa lipídica, vesícula o liposoma; y (2) cualquier agregado de moléculas en forma sólida o insolubilizada, como una matriz de microesferas de cromatografía, que no libera la molécula heterogénea en solución al contacto con una fase acuosa. Por consiguiente, el término "conjugado" como se define en el presente documento abarca la molécula heterogénea mencionada anteriormente en un precipitado, sedimento, matriz bioerosionable u otro sólido capaz de liberar la molécula heterogénea en solución acuosa tras la hidratación del sólido.

[0045] El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Cada mAb se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque pueden sintetizarse mediante cultivo de hibridoma o líneas celulares de mamífero, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden prepararse en una célula B inmortalizada o hibridoma de la misma, o pueden hacerse mediante métodos de ADN recombinante.

[0046] Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos al unir un dominio variable (incluyendo hipervariable) de un anticuerpo anti-CD47 con un dominio constante (p. ej., anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de la especie de origen o la

designación de clase o subclase de inmunoglobulina, así como fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab, F(ab')2 y Fv), mientras que exhiben la actividad biológica deseada.

[0047] Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada.

[0048] Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más del 75% en peso de anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, y lo más preferiblemente más del 80%, 90% o 99% en peso, o (2) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0049] El término "epítopo etiquetado" cuando se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo anti-CD47 fusionado a una "etiqueta de epítopo". El polipéptido de etiqueta de epítopo tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el cual se puede formar un anticuerpo, pero es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del anticuerpo CD47. La etiqueta de epítopo preferiblemente es lo suficientemente única como para que el anticuerpo específico para el epítopo no reaccione de forma sustancial con otros epítopos. Los polipéptidos de etiqueta adecuados generalmente tienen al menos 6 residuos de aminoácidos y usualmente entre aproximadamente 8-50 residuos de aminoácidos (preferiblemente entre aproximadamente 9-30 residuos). Los ejemplos incluyen la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 a los mismos (Evan GI, Lewis GK, Ramsay G., et al. "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product", Mol. Cell. Biol. 5 (12): 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo (Paborsky LR, Fendly BM, Fisher KL, et al. "Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen", Protein Engineering 3 (6): 547 -553 (1990)).

[0050] La palabra "etiqueta" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (p. ej., marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

[0051] Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas incluidas en el presente documento incluyen aquellas formadas parcial o totalmente de vidrio (p. ej., vidrio de poro controlado), polisacáridos (p. ej., agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente de EE.UU. Nº 4,275,149.

Glicosilación de CD47

[0052] CD47 está sujeto a modificaciones postraduccionales, más notablemente glicosilación. CD47 tiene varios sitios de glicosilación N-terminal que afectan directamente la visualización de la superficie celular y regulan la interacción con ligandos extracelulares. Por ejemplo, el CD47 desglicosilado tiene una mayor avidez por SIRPα que el CD47 glicosilado y, viceversa, el SIRPα desglicosilado tiene una mayor avidez por CD47 (Subramanian S., Boder E.T. y Discher D. E. "Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein α reveals locus of species specificity." J. Biolog. Chem. 282(3):1805-18 (2007); Subramanian S., Parthasarathy R., Sen S., Boder E.T. y Discher D. E. "Species and cell type-specific interactions between CD47 and human SIRPα". Blood 107(6):2548-56 (2006)). A la inversa, el SIRPα hiperglicosilado puede alterar las interacciones CD47/SIRPα (Ogura T., Noguchi T., Murai-takebe R., Hosooka T., Honma N. y Kasuga M. "Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced negative regulation of motility as a result of aberrant N-glycosylation of SHPS-1". J Biol Chem 279(14):13711-20 (2004)). Es de destacar que la mutagénesis dirigida al sitio de los sitios de glicosilación unidos a N inhibió la localización de la superficie celular de CD47 en modelos de levadura (Parthasarathy R., Subramanian S., Boder E.T. y Discher D. E. "Post-Translational Regulation of Expression and conformation of an Immunoglobulin Domain in Yeast Surface Display". Biothech Bioin 93(1):159-68 (2006)), aunque una mutagénesis similar no afectó la localización de la membrana de CD47 humano en células CHO (Subramanian et al., 2006, supra). La glicosilación aberrante de CD47 o SIRPα también puede alterar las respuestas posteriores, con SIRPα diferencialmente glicosilada que hace que las células de melanoma B16 sean resistentes a la inhibición de la motilidad inducida por CD47 (Ogura et al., 2004, supra). Además, se ha detectado una forma de CD47 fuertemente glucosilada (>250 kD) en células T primarias y

transformadas, células endoteliales y células del músculo liso vascular (Kaur S., Kuznetsova S.A., Pendrak M.L., Romeo M.J., Li Z., Zhang L., y Roberts D.D. "Heparan Sulfate Modification of the Transmembrane Receptor CD47 Is Necessary for Inhibition of T Cell Receptor Signaling by Thrombospondin-1", J Biol Chem 286(17):14991-15002 (2011)). Esta modificación se localizó distalmente desde el sitio de unión de SIRPα, pero fue necesaria para la señalización inhibitoria mediada por TSP-1 en las células T.

[0053] Dado que las células tumorales pueden expresar patrones de glucosilación aberrantes, sería deseable proporcionar anticuerpos anti-CD47 que se unan a CD47 independientemente de la glucosilación. Sin embargo, mientras que los anticuerpos anti-CD47 terapéuticamente relevantes conocidos típicamente se unen de manera efectiva al CD47 glicosilado, típicamente se unen pobremente (p. ej., con una afinidad de unión más baja/constante de unión de equilibrio más alta o una capacidad de unión máxima reducida (Bmax)) a CD47 no glicosilado o desglicosilado.

[0054] En un aspecto, los anticuerpos de la presente invención se unen a CD47 glicosilado y no glicosilado. Por ejemplo, en una realización, la unión del anticuerpo a CD47 no depende de la glucosilación de CD47. Con esto se quiere decir que no se requiere la glucosilación de CD47 para una unión adecuada del anticuerpo a CD47, p. ej., el anticuerpo muestra una unión específica significativa a CD47 independientemente del nivel de glucosilación de CD47. En otras palabras, la unión del anticuerpo a CD47 es al menos parcial, significativa o sustancialmente independiente de la glucosilación.
Como se usa en el presente documento, CD47 "glicosilado" se refiere típicamente a CD47 (p. ej., humano) que se ha N-glicosilado en uno o más residuos. El CD47 humano puede estar N-glicosilado en uno o más residuos (p. ej., asparagina) en las posiciones N23, N34, N50, N73, N111 y N206 en la secuencia de aminoácidos del CD47 humano (SEQ ID NO: 151). Preferiblemente, el CD47 glicosilado está glicosilado al menos en dos, tres, cuatro, cinco o seis de las posiciones anteriores.

[0055] El CD47 "desglicosilado" se refiere a una forma de CD47 en donde se han eliminado una o más cadenas de glucano (p. ej., N-glucanos). La desglicosilación de CD47 puede efectuarse mediante el tratamiento con una enzima como el péptido N-glucosidasa (PNGasa), p. ej., PNGasa F, que elimina los N-glucanos. Los términos "no glicosilado" y "desglicosilado" se usan aquí de manera intercambiable. Por lo tanto, la forma no glucosilada o desglucosilada carece típicamente de residuos de glucano en las posiciones N23, N34, N50, N73, N111 y/o N206 en la secuencia de aminoácidos del CD47 humano (SEQ ID NO: 151).

[0056] En una realización, la desglicosilación de CD47 no afecta significativamente la avidez/afinidad y/o capacidad de unión máxima del anticuerpo contra CD47 (humano). La avidez/afinidad y la capacidad de unión máxima (Bmax) del anticuerpo para las formas glicosiladas y desglicosiladas de CD47 pueden determinarse usando ensayos estándar, p. ej., como se expone en los ejemplos a continuación. La afinidad de un anticuerpo por su epítopo diana está inversamente relacionada con su constante de disociación. La constante de disociación también puede estar directamente relacionada con el valor de CE_{50} para la unión del anticuerpo a CD47. CE_{50} es la concentración de anticuerpo que proporciona la mitad de la unión máxima, es decir, a la que se une el 50% de los sitios de unión en CD47. Además, el valor de CE95, que es la concentración de anticuerpo que proporciona una unión máxima del 95%, es indicativo de la concentración de anticuerpo para la que se une el 95% de los sitios de unión en CD47.

[0057] Cualquiera que sea la medida utilizada, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, lo importante son los valores relativos obtenidos para las formas glicosiladas y no glicosilados, es decir, no es necesario determinar necesariamente un valor absoluto siempre que las formas glicosiladas y no glicosilados muestren resultados razonablemente similares.

[0058] Por lo tanto, en algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo por las formas no glicosilados y glicosiladas de CD47 puede compararse determinando una relación de valores de CE50 o valores de CE95 para la unión del anticuerpo a cada forma. Preferiblemente, esta relación es inferior a 5:1, 4:1, 3:1 o 2:1, pero puede ser incluso mayor para la CE95, es decir, puede ser 25:1, 20:1, 10:1, preferiblemente en un intervalo de 10:1 a 1:10, más preferiblemente de 9:1 a 1:9, lo más preferiblemente de 10:1 a 1:10. En otras palabras, la CE50 para la unión del anticuerpo a CD47 no glicosilado puede ser no más de 3 o 2 veces mayor que el valor de CE50 para la unión del anticuerpo a CD47 glicosilado. La CE95 para la unión del anticuerpo a CD47 no glicosilado no puede ser más de 9 o 10 veces mayor que el valor de CE95 para la unión del anticuerpo a CD47 glicosilado. En realizaciones adicionales, la relación de CE50 está preferiblemente en el intervalo de 3:1 a 1:3 o 2:1 a 1:2, lo más preferiblemente 3:1 a 1:3; o la proporción de CE95 está preferiblemente en el intervalo de 10:1 a 1:10, más preferiblemente de 9:1 a 1:9, lo más preferiblemente de 10:1 a 1:10. En tales realizaciones se considera que la desglicosilación no afecta significativamente la afinidad de unión, es decir, la unión del anticuerpo a CD47 no depende de la glucosilación. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une a la forma no glicosilado de CD47 (y preferiblemente a las formas no glicosilados y glicosiladas de CD47) con una constante de unión de equilibrio de 80 pM o inferior, preferiblemente 70 pM o inferior, más preferiblemente 60 pM o inferior.

[0059] En otras realizaciones, la desglicosilación de CD47 no reduce significativamente la capacidad máxima de unión del anticuerpo a CD47. Por ejemplo, la capacidad de unión máxima (es decir, $Bmax_1$) puede determinarse para la unión del anticuerpo a CD47 glicosilado. $Bmax_1$ se refiere al nivel de unión del anticuerpo a CD47 a una concentración

de anticuerpo en exceso, es decir, el nivel máximo de unión específica entre el anticuerpo y CD47. $Bmax_1$ es, por lo tanto, una medida de la concentración de sitios de unión disponibles para el anticuerpo en CD47 glicosilado. Entonces, CD47 puede desglicosilarse (p. ej., usando PNGasa) y el nivel de unión a CD47 a una concentración de anticuerpo en exceso se determina una vez más (a la misma concentración de CD47 en la muestra). La capacidad de unión máxima (es decir, $Bmax_2$) del anticuerpo para CD47 desglicosilada es, por lo tanto, una medida de la concentración de sitios de unión disponibles para el anticuerpo en CD47 desglicosilada.

[0060] En realizaciones preferidas, la capacidad de unión máxima (es decir, $Bmax_2$) del anticuerpo contra CD47 no glicosilado es al menos 60%, o al menos 70% de la capacidad de unión máxima (es decir, $Bmax_1$) del anticuerpo contra CD47 glicosilado. En tales realizaciones, se considera que la desglicosilación no afecta significativamente la capacidad de unión máxima, es decir, la unión del anticuerpo a CD47 no depende de la glicosilación.

[0061] En realizaciones adicionales, las propiedades de unión del anticuerpo a formas glicosiladas y desglicosiladas de CD47 pueden compararse en base a una relación de valores de CE95. CE95 es la concentración de anticuerpo a la que se une el 95% de los sitios de unión en CD47. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo por las formas no glicosilados y glicosiladas de CD47 puede compararse determinando una relación de valores de CE95 para la unión del anticuerpo a cada forma. Preferiblemente, esta relación es inferior a 10:1 o 9:1. En otras palabras, la CE95 para la unión del anticuerpo a CD47 no glicosilado no puede ser más de 10 o 9 veces mayor que la CE95 para la unión del anticuerpo a la glicosilación CD47.

Cinética de disociación de anticuerpos

[0062] En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan anticuerpos anti-CD47 que tienen una velocidad de disociación (Koff) de CD47 dentro de un intervalo definido. En particular, ha sido demostrado que los anticuerpos anti-CD47 con una alta tasa de disociación caracterizada por un valor de Koff superior a $1 \times 10^{-3}\ s^{-1}$ se desprenden fuerte y rápidamente de los glóbulos rojos, pero también pierden rápidamente la mayor parte de su actividad funcional en las células tumorales, p. ej., mejora de fagocitosis de células tumorales. En contraste, los anticuerpos anti-CD47 con una tasa de disociación muy lenta caracterizada por un valor de Koff inferior a $1 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ se desprenden más lentamente de las células tumorales, pero permanecerán atrapados en los glóbulos rojos y, por lo tanto, pueden tener un importante efecto de hundimiento y posiblemente más efectos secundarios.
Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD47 con una cinética de disociación intermedia caracterizada por un valor de Koff comprendido entre 1×10^{-4} y $1 \times 10^{-3}\ s^{-1}$ poseen un equilibrio óptimo de unión/liberación de CD47, es decir, proporcionan un efecto de hundimiento débil y efectos secundarios mientras que se mantiene su eficacia antitumoral. Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une a CD47 y un valor de Koff para la unión a CD47 comprendido entre $1{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1{,}0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$. En realizaciones particulares, el anticuerpo puede unirse al CD47 glicosilado y/o no glicosilado con un valor de Koff en este intervalo. Preferentemente, el anticuerpo tiene un valor de Koff para la unión a CD47 (p. ej., glicosilada y/o no glicosilado) comprendido entre $1{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1{,}0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$, $2{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1{,}0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$, $2{,}5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $8{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$, $2{,}5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $5{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$, o $3{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $4{,}5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$.

Anticuerpos

[0063] En un aspecto, la presente invención está dirigida a anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de ratón que se unen específicamente al CD47 humano, y a las líneas celulares que producen dichos anticuerpos. Dichos anticuerpos anti-CD47 de la invención muestran diversas características deseables para la terapia contra el cáncer (pero no se limitan a ellas), tales como la interrupción potente de la interacción CD47-SIRPα independientemente del isotipo del anticuerpo (y las funciones efectoras), una cinética rápida de disociación con los valores de Koff en el intervalo de $1{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1{,}0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$, $2{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1{,}0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$, $2{,}5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $8{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$, $2{,}5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $5{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$, o $3{,}0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $4{,}5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ (en donde los anticuerpos de referencia muestran valores de Koff más bajos entre 5,0 a $8{,}9 \times 10^{-5}\ s^{-1}$). Además, los anticuerpos de la invención se liberan rápidamente después de unirse a CD47 en los glóbulos rojos (en donde los anticuerpos de referencia con valores de Koff más bajos se liberan más lentamente). Además, los anticuerpos anti-CD47 de la invención permiten la fagocitosis eficiente de células tumorales que expresan CD47 por macrófagos humanos derivados de monocitos. Además, los anticuerpos anti-CD47 de la invención muestran inhibición del crecimiento tumoral en modelos de ratón de xenoinjerto que sobreexpresan el CD47 diana. Además, dichos anticuerpos tienen al menos una de las siguientes características: interrumpen la interacción CD47-SIRPα, se unen a CD47 glicosilado y no glicosilado con una proporción de CE_{50} en CD47 desglicosilado frente a CD47 glicosilado no superior a 3,0 y una proporción de CE95 en CD47 desglicosilada versus CD47 glicosilado no superior a 10,0, inhibe la transducción de señal CD47-SIRPα, aumenta la fagocitosis de ciertas células que expresan CD47, no causa un nivel significativo de aglutinación de las células y encuentra uso en varios métodos terapéuticos y de diagnóstico. Se prefieren los anticuerpos que se unen al CD47 humano y que están en el formato IgG4 con mutación(es) opcional(es) (p. ej., reemplazo de aminoácidos para eliminar el (los) epítopo(s) de células T incluso en la región CDR tal como CDR2). Una realización preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que muestran adicionalmente una débil actividad de aglutinación de glóbulos rojos que sugiere baja toxicidad adicional (NOs candidatos 19, 33, 20 (incluidos los anticuerpos humanizados y de ingeniería adicional del candidato 20)) y/o no inducen (o solo inducen ligeramente) la apoptosis de las células Jurkat (NOs candidatos 7, 19, 20 (incluidos los anticuerpos humanizados y de ingeniería adicional del candidato 20), 22 (incluidos los anticuerpos humanizados y de

ingeniería adicional del candidato 22), 33). Además, una realización más preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen adicionalmente a CD47 glicosilado y no glicosilado extracelularmente o se unen a un fragmento inmunológicamente activo y glicosilado y no glicosilado del mismo. Además, una realización más preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen al monómero y al dímero de CD47, tal como CD47 humano. Además, una realización más preferida de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen a un epítopo particular en CD47, es decir, en particular, un epítopo discontinuo que comprende K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 y T120 de CD47 humano cuando se numera de acuerdo con SEQ ID NO: 151 (p. ej., candidato 20 y versión humanizada y modificada por ingeniería genética de los mismos). Otro ejemplo de una realización de la invención es un grupo de anticuerpos anti-CD47 que se unen a un epítopo particular en CD47, es decir, en particular, un epítopo discontinuo que comprende K59, K61, S107, H108, T117, T120 y R121 de CD47 humano cuando se numeran de acuerdo con la SEQ ID NO: 151 (p. ej., el candidato 22 y la versión humanizada y modificada de los mismos).

[0064] Los candidatos preferidos son los candidatos 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 y 33. Incluso los candidatos más preferidos son 7, 19, 20, 22 y 33. Incluso los candidatos más preferidos son 20 y 22. El candidato más preferido es candidato 20 (incluidos los anticuerpos humanizados y de ingeniería adicional del candidato 20, es decir, candidatos 20,1 a 20,30). Se proporcionan las CDR (en las anotaciones KABAT- (Tabla 2) e IMGT- (Tabla 3)) y las regiones variables (Tabla 1) de anticuerpos ejemplares (referidos aquí generalmente por NOs candidatos o nombre de anticuerpo) (se prefieren las anotaciones IMGT). Los anticuerpos de interés incluyen estas combinaciones proporcionadas, así como fusiones de las regiones variables a regiones constantes apropiadas o fragmentos de regiones constantes, p. ej., para generar anticuerpos F(ab)'. Las regiones variables de interés incluyen al menos una secuencia de CDR de los anticuerpos anti-CD47 proporcionados, donde una CDR puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más aminoácidos. Alternativamente, los anticuerpos de interés incluyen una región variable como se establece en los anticuerpos proporcionados, o pares de secuencias de regiones variables como se establece en el presente documento. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos de longitud completa, p. ej., que tienen una región constante de inmunoglobulina humana de cualquier isotipo, p. ej., lgGl, lgG2, lgG3, lgG4, lgA, más preferiblemente lgG4 opcionalmente con mutación(es), p. ej., en donde algunos o todos los epítopos de células T) incluso si en la región CDR se reemplazan, p. ej., por aminoácidos conservadores silenciosos (ver también la parte experimental para ejemplos), ejemplos tales como las mutaciones S228P y L235E, es decir, en donde las mutaciones S228P y L235E se introducen para evitar posibles intercambios de cadena y para disminuir la afinidad de hIgG4 a los receptores gamma Fc, respectivamente.

Tabla 1: Candidatos seleccionados con número de candidato, nombre de anticuerpo, región variable de SEQ ID NO de la cadena pesada (VH) y región variable de la cadena ligera (VL) SEQ ID NO:

NO candidato	Nombre de anticuerpo	Región variable de cadena pesada (también denominada aquí como "VH") SEQ ID NO	Región variable de cadena ligera (también denominada aquí como "VL") SEQ ID NO
7	VT008-AL5-10G7-10K7	121	122
14	VT008-AL6-14G1-16K1	123	124
15	VT008-AL6-18G1-18K21	125	126
19	VT008-AL17-7G1-7K6	127	128
20	VL008-AL18-14G4-14K1	129	130
22	VL008-AL13-8G5-8K3	131	132
26	VT008-AL6-10G3-10K1	133	134
29	VT008-AL6-20G7-20K7	135	136
30	VT008-AL6-39G2-39K2	137	138
33	VL008-AL17-8G5-8K7	139	140
20,1	H20-VH1-VL1	141	146
20,2	H20-VH1-VL2	141	147
20,3	H20-VH1-VL3	141	148
20,4	H20-VH1-VL4	141	149
20,5	H20-VH1-VL5	141	150
20,6	H20-VH2-VL1	142	146
20,7	H20-VH2-VL2	142	147

(Continuación)

NO candidato	Nombre de anticuerpo	Región variable de cadena pesada (también denominada aquí como “VH”) SEQ ID NO	Región variable de cadena ligera (también denominada aquí como “VL”) SEQ ID NO
20,8	H20-VH2-VL3	142	148
20,9	H20-VH2-VL4	142	149
20,10	H20-VH2-VL5	142	150
20,11	H20-VH3-VL1	143	146
20,12	H20-VH3-VL2	143	147
20,13	H20-VH3-VL3	143	148
20,14	H20-VH3-VL4	143	149
20,15	H20-VH3-VL5	143	150
20,16	H20-VH4-VL1	144	146
20,17	H20-VH4-VL2	144	147
20,18	H20-VH4-VL3	144	148
20,19	H20-VH4-VL4	144	149
20,20	H20-VH4-VL5	144	150
20,21	H20-VH5-VL1	145	146
20,22	H20-VH5-VL2	145	147
20,23	H20-VH5-VL3	145	148
20,24	H20-VH5-VL4	145	149
20,25	H20-VH5-VL5	145	150
20,26	H20-VH2-VL5, Y; H20-H2-L5Y	142	159
20,27	H20-VH3-VL2, Y; H20-H3-L2Y	143	156
20,28	H20-VH3-VL3, Y; H20-H3-L3Y	143	157
20,29	H20-VH4-VL4, Y; H20-H4-L4Y	144	158
20,30	H20-VH4-VL5, Y; H20-H4-L5Y	144	159
20,Y	VL008-AL18-14G4-14K1, Y	129	154
22,1	H22-VH1-VL1	168	172
22,2	H22-VH1-VL2	168	173
22,3	H22-VH1-VL3	168	174
22,4	H22-VH1-VL4	168	175
22,5	H22- VH2-VL1	169	172
22,6	H22-VH2-VL2	169	173
22,7	H22-VH2-VL3	169	174
22,8	H22-VH2-VL4	169	175
22,9	H22-VH3-VL1	170	172
22,10	H22-VH3-VL2	170	173
22,11	H22-VH3-VL3	170	174
22,12	H22- VH3-VL4	170	175
22,13	H22-VH4-VL1	171	172
22,14	H22-VH4-VL2	171	173
22,15	H22-VH4-VL3	171	174
22,16	H22-VH4-VL4	171	175

Tabla 2: Candidatos seleccionados con número de candidato, nombre de anticuerpo, CDR de SEQ ID NO de cadena pesada (VH) y CDR de SEQ ID NO de cadena ligera (VL) (anotaciones KABAT):

NO candidato	Nombre de anticuerpo	SEQ ID NO de CDR1 de VH	SEQ ID NO de CDR2 de VH	SEQ ID NO de CDR3 de VH	SEQ ID NO de CDR1 de VL	SEQ ID NO de CDR2 de VL	SEQ ID NO de CDR3 de VL
7	VT008-AL5-10G7-10K7	1	2	3	7	8	9
14	VT008-AL6-14G1-16K1	13	14	15	19	20	21
15	VT008-AL6-18G1-18K21	25	26	27	31	32	33
19	VT008-AL17-7G1-7K6	37	38	39	43	44	45
20	VT008-AL18-14G4-14K1	49	50	51	55	56	57
22	VT008-AL13-8G5-8K3	61	62	63	67	68	69
26	VT008-AL6-10G3-10K1	73	74	75	79	80	81
29	VT008-AL6-20G7-20K7	85	86	87	91	92	93
30	VT008-AL6-39G2-39K2	97	98	99	103	104	105
33	VT008-AL17-8G5-8K7	109	110	111	115	116	117
20, epítopo de célula T corregido	VT008-AL18-14G4-14K1, epítopo de célula T corregido	49	50	51	55	152	57

Tabla 3: Candidatos seleccionados con número de candidato, nombre de anticuerpo, CDR de SEQ ID NO de cadena pesada (VH) y CDR de SEQ ID NO de cadena ligera (VL) (anotaciones IMGT):

NO candidato	Nombre de anticuerpo	SEQ ID NO de CDR1 de VH	SEQ ID NO de CDR2 de VH	SEQ ID NO de CDR3 de VH	SEQ ID NO de CDR1 de VL	SEQ ID NO de CDR2 de VL	SEQ ID NO de CDR3 de VL
7	VT008-AL5-10G7-10K7	4	5	6	10	11	12
14	VT008-AL6-14G1-16K1	16	17	18	22	23	24
15	VT008-AL6-18G1-18K21	28	29	30	34	35	36
19	VT008-AL17-7G1-7K6	40	41	42	46	47	48

(Continuación)

NO candidato	Nombre de anticuerpo	SEQ ID NO de CDR1 de VH	SEQ ID NO de CDR2 de VH	SEQ ID NO de CDR3 de VH	SEQ ID NO de CDR1 de VL	SEQ ID NO de CDR2 de VL	SEQ ID NO de CDR3 de VL
20	VT008-AL18-14G4-14K1	52	53	54	58	59	60
22	VT008-AL13-8G5-8K3	64	65	66	70	71	72
26	VT008-AL6-10G3-10K1	76	77	78	82	83	84
29	VT008-AL6-20G7-20K7	88	89	90	94	95	96
30	VT008-AL6-39G2-39K2	100	101	102	106	107	108
33	VT008-AL17-8G5-8K7	112	113	114	118	119	120
20, epítopo de célula T corregido	VT008-AL18-14G4-14K1, epítopo de célula T corregido	52	53	54	58	153	60

[0065] Además de Fabs, la presente invención también contempla fragmentos de anticuerpos más pequeños y péptidos de unión a epítopo que tienen especificidad de unión para al menos un epítopo de CD47 y también pueden usarse en los métodos de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla pueden construirse de acuerdo con el método de la patente de EE.UU. 4,946,778, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Los anticuerpos de cadena sencilla comprenden las regiones variables de las cadenas ligera y pesada unidas por un resto enlazador flexible. Aún más pequeño es el fragmento de anticuerpo conocido como anticuerpo de dominio único, que comprende un dominio único VH aislado. Las técnicas para obtener un anticuerpo de dominio único con al menos algo de la especificidad de unión del anticuerpo intacto del que derivan se conocen en la técnica. Por ejemplo, Ward et al. (Ward S., Giissow D., Griffiths A.D., Jones P.T. y Winter G. "Binding Activities of a Repertoire of Single Immunoglobulin Variable Domains Secreted from *Escherichia coli*" Nature 341: 544-46 (1989)), divulgan un método para cribado para obtener una región variable de cadena pesada de anticuerpo (anticuerpo de dominio único H) con suficiente afinidad para que su epítopo diana se una al mismo en forma aislada.

[0066] La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-CD47 humanizados o quiméricos, vectores y células huésped que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo. Los ácidos nucleicos de interés pueden ser al menos aproximadamente 80% idénticos a las secuencias de ácido nucleico proporcionadas, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 99% o idénticos. Dichas secuencias contiguas pueden codificar una secuencia de CDR, o pueden codificar una región variable completa. Como se sabe en la técnica, una secuencia de región variable puede fusionarse con cualquier secuencia de región constante apropiada.

[0067] Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se inserta en un vector replicable para su posterior clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0068] El anticuerpo anti-CD47 de esta invención puede producirse de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo u homólogo, que incluye una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o

polipéptido, una secuencia de región constante de inmunoglobulina, y similares. Una secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente puede ser una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa de señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal del anticuerpo nativo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada.

[0069] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que normalmente se asocia en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o entorno en donde se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo donde, p. ej., la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0070] Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN son las células procariotas, levaduras o eucariotas superiores. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); células de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham F.L. y Smiley J. "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5", J. Gen. Virol. 36: 59-72 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); Células de ovario de hámster chino; Células de ovario de hámster chino/dhFr-(CHO/dhFr- , Urlaub G. y Chasin LA "Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity", Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77 (7): 4216-20 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather JP "Establishment and characterization of two distinct mouse testicular epithelial cell lines", Biol. Reprod. 23 (1): 243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata de búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); células tumorales mamarias de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather J.P., Zhuang L.Z., Pérez-Infante V. y Phillips D.M. "Culture of testicular cells in hormone-supplemented serum-free medium", Annals NY Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células EB66 (véase, p. ej., EP 2150275B1); células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-CD47 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0071] La composición de anticuerpos preparada a partir de las células puede purificarse usando, p. ej., cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas γ1, γ2 o γ4 humanas (Lindmark R., Thoren-Tolling K., Sjöquist J. "Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera", J. Immunol. Meth. 62 (1): 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para γ3 humano (Guss M., Eliasson M., Olsson A., Uhlen M., Frej A.K., Jornvall H., Flock J.I. y Lindberg M. "Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G", EMBO J. 5(1): 1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unido el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero hay otras matrices disponibles.
Las matrices mecánicamente estables, como el vidrio de poro controlado o el poli(estirendivinilo)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatofocalización, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0072] Después de cualquier etapa(s) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizado a bajas concentraciones de sal (p. ej., de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Métodos de uso

[0073] Los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la invención se pueden usar en la modulación de la fagocitosis, incluidos los métodos establecidos en la Solicitud Internacional US2009/000319, incorporada aquí específicamente como referencia en su totalidad. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar para aumentar la fagocitosis de las células cancerígenas que expresan CD47 y, por lo tanto, son adecuadas para el tratamiento del cáncer en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la invención.

[0074] También se proporcionan composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento del cáncer que comprenden los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la invención y, opcionalmente, excipientes o vehículos farmacéuticamente adecuados.

[0075] Los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la invención pueden usarse *in vitro* e *in vivo* para controlar el curso de la terapia de la enfermedad CD47. Así, p. ej., midiendo el aumento o la disminución en el número de células que expresan CD47, particularmente las células cancerígenas que expresan CD47, se puede determinar si un régimen terapéutico particular dirigido a mejorar la enfermedad es efectivo.

[0076] En una realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanizados o quiméricos de la invención pueden usarse para tratar, retrasar la progresión de, prevenir la recaída o aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica, como una monoterapia, o en combinaciones con otros agente(s) anti-cancer (terapia de combinación). Como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "neoplasia" y "tumor" son intercambiables. Los ejemplos de cáncer incluyen, sin limitación, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematológico, carcinoma, melanoma, leiomioma, leiomiosarcoma, glioma, glioblastoma, etc. El "cáncer hematológico" se refiere a un cáncer de la sangre e incluye leucemia, linfoma y mieloma, entre otros. Los tumores sólidos incluyen, p. ej., tumor gástrico, tumores de mama, tumores de pulmón, tumores de ovario, tumores de próstata, tumores de vejiga, tumores colorrectales, tumores pancreáticos, tumores de hígado, tumores de riñón, tumor de tiroides, tumor cerebral, tumores de cabeza y cuello, tumores de esófago y tumores de melanoma, etc. Los síntomas asociados con cánceres y otros trastornos neoplásicos incluyen, entre otros, inflamación, fiebre, malestar general, dolor, pérdida de apetito, pérdida de peso, edema, dolor de cabeza, fatiga, erupción cutánea, anemia, debilidad muscular y fatiga muscular.

[0077] La terapia de combinación puede incluir uno o más anticuerpos de la invención formulados conjuntamente y/o administrados conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, p. ej., agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos, tales como inhibidores de la citocina y del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos y/o agentes citotóxicos o citostáticos. El término "combinación" en este contexto significa que los agentes se administran sustancialmente de forma contemporánea, ya sea simultánea o secuencialmente. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, aldesleucina, altretamina, amifostina, asparaginasa, bleomicina, capecitabina, carboplatino, carmustina, cladribina, cisaprida, cisplatino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, doxorubicina, dronabinol, duocarmicina, etopósido, filgrastim, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, granisetrón, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, interferón alfa, irinotecan, lansoprazol, levamisol, leucovorina, megestrol, mesna, metotrexato, metoclopramida, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, omeprazol, ondansetrón, paclitaxel (Taxol™), pilocarpina, procloroperazina, saproina, tamoxifeno, taxol, clorhidrato de topotecan, vinblastina, vincristina y tartrato de vinorelbina.

[0078] Los anticuerpos de la invención pueden combinarse con una dosis efectiva de un agente que aumenta el hematocrito del paciente, p. ej., agentes estimulantes de la eritropoyetina (ESA). Dichos agentes son conocidos y utilizados en la técnica, incluidos, p. ej., Aranesp®, Epogen®NF/Procrit®NF, Omontys®, Procrit®, etc.

[0079] En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se pueden combinar con una dosis efectiva de otros anticuerpos que se han usado en el tratamiento del cáncer, que incluyen, sin limitación, los siguientes anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA: rituximab (Rituxan®, CD20: IgG1 quimérico), trastuzumab (Herceptin®, HER2: quimérico IgGl), alemtuzumab (Campath®, CD52: humanizado IgGl), ibritumomab tiuxetan (Zevalin, CD20: murino, IgGl, radiomarcado (itrio 90), tositumomab-I-131 (Bexxar®: CD20, murino, IgG2a, radiomarcado (yodo 131)), cetuximab (Erbitux®, EGFR: cjimeric, IgGl), bevacizumab (VEGF: humanizados, IgG4), panitumumab (Vectibix®, EGFR: IgG2 humano), ofatumumab (Arzerra®, CD20: IgG1 humana), ipilimumab (Ypervoy®, CTLA-4: IgG1 humana), brentiuximab vedotina (Adectris®, CD30: quimérico, IgGl, conjugado de drogas), pertuzumab (Perjecta®, HER2: IgGl humanizada, conjugado de drogas), adotrastuzumab ematansina (Kadcyla®, HER2: humanizado, IgG1, conjugado de drogas), obinutuzumab (Gazyva®, CD20: humanizado y diseñado con glicol), nivolumab y pembrolizumab (anti-PD-ls), etc. Trastuzumab se dirige al antígeno HER-2. Este antígeno se observa en el 25% al 35% de los cánceres de seno y en los cánceres gástricos metastásicos. Trastuzumab está aprobado para el tratamiento de los cánceres de seno que sobreexpresan HER2 y para el adenocarcinoma de la unión gástrica y gastroesofágica metastásica que sobreexpresa HER2. El cetuximab se usa para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico, el cáncer de pulmón metastásico de células no pequeñas y el cáncer de cabeza y cuello. El nivolumab y el pembrolizumab han sido aprobados recientemente para tratar el melanoma metastásico y el cáncer de pulmón no microcítico. Se prueban en ensayos clínicos para cáncer de pulmón, cáncer de células renales, linfoma y mesotelioma. También se pueden combinar otros medicamentos contra el cáncer que actualmente se prueban en ensayos clínicos o investigaciones.

[0080] Las combinaciones preferidas son combinaciones de un anticuerpo CD47 de la invención y i) un inhibidor del punto de control inmunitario o ii) un modulador inmunitario que reprograma la actividad antitumoral de los macrófagos y las células dendríticas o iii) un anticuerpo contra un antígeno asociado a un tumor. Combinaciones ejemplificadas están descritas en el presente documento por Herceptin® y Erbitux®, en donde la combinación con Herceptin® se prefiere debido a su aditivo, o efecto cooperativo, posiblemente sinérgico. También puede ser útil combinar otros agentes.

[0081] Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden usarse *in vitro* en inmunoensayos en los que pueden utilizarse en fase líquida o unirse a un vehículo en fase sólida. Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos pueden marcarse de manera detectable de varias maneras. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la invención son citometría de flujo, p. ej., FACS, MACS, inmunohistoquímica, inmunoensayos competitivos y no competitivos en formatos directos o indirectos; y similares. La detección de los antígenos usando los anticuerpos monoclonales de la invención se puede hacer utilizando inmunoensayos que se ejecutan en los modos directo, inverso o simultáneo, incluidos los ensayos inmunohistoquímicos en muestras fisiológicas. Los expertos en la materia conocerán, o podrán discernir fácilmente, otros formatos de inmunoensayo sin experimentación excesiva.

[0082] Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para detectar la presencia de células que expresan CD47. Los ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosa y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los fines de la invención. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para unir anticuerpos monoclonales, o podrán determinarlos, utilizando experimentación de rutina.

[0083] Hay muchas etiquetas y métodos de etiquetado diferentes conocidos por los expertos en la técnica, que encuentran uso como trazadores en métodos terapéuticos, para uso en métodos de diagnóstico y similares. Para fines de diagnóstico, una etiqueta puede estar unida de forma covalente o no covalente a un anticuerpo de la invención o un fragmento del mismo, incluidos fragmentos que consisten o comprenden secuencias de CDR. Los ejemplos de los tipos de marcadores que pueden usarse en la presente invención incluyen enzimas, radioisótopos, compuestos fluorescentes, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes y compuestos bioluminiscentes. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para unirse a los anticuerpos monoclonales de la invención, o podrán determinarlos, utilizando experimentación de rutina. Además, la unión de estos marcadores a los anticuerpos monoclonales de la invención se puede realizar utilizando técnicas estándar comunes a los expertos en la materia.

[0084] En algunas realizaciones, el anticuerpo o un fragmento del mismo está unido a una nanopartícula, p. ej., para uso en formación de imágenes. Las nanopartículas útiles son las conocidas en la técnica, p. ej., incluidas, entre otras, las nanopartículas Raman-sílice-oro (R-Si-Au-NP). Los R-Si-Au-NP consisten en una molécula orgánica Raman, con una firma espectral de banda estrecha, adsorbida en un núcleo de oro. Debido a que la molécula orgánica Raman se puede cambiar, cada nanopartícula puede llevar su propia firma, lo que permite que múltiples nanopartículas se detecten independientemente de forma simultánea mediante multiplexación. Toda la nanopartícula está encapsulada en una cubierta de sílice para mantener la molécula orgánica Raman en el nanonúcleo de oro. La polilación opcional de polietilenglicol (PEG) de R-Si-Au-NP aumenta su biodisponibilidad y proporciona "asas" funcionales para unir restos de direccionamiento (ver Thakor AS, Luong R., Paulmurugan R., et al. Et al. "The fate and toxicity of raman-active silica-gold nanoparticles in mice", Sci. Transl. Med. 3 (79): 79ra33 (2011); Jokerst JV, Miao Z., zavaleta C, Cheng Z. y Gambhir S.S. "Affibody-functionalized gold-silica nanoparticles for Raman molecular imaging of the epidermal growth factor receptor", Small. 7(5):625-33 (2011); Gao J., Chen K., Miao Z., Ren G., Chen X., Gambhir S.S., Cheng Z. "Affibody-based nanoprobes for HER2-expressing cell and tumor imaging", Biomaterials 32(8):2141-8 (2011);

[0085] Para los fines de la invención, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden detectar CD47 cuando está presente en fluidos biológicos y en tejidos, *in vivo* o *in vitro*. Se puede usar cualquier muestra que contenga una cantidad detectable de CD47. Una muestra puede ser un líquido como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero y similares, o un sólido o semisólido como tejidos, heces y similares, o, alternativamente, un tejido sólido como los comúnmente utilizados en diagnóstico histológico.

[0086] Otra técnica de marcado que puede dar como resultado una mayor sensibilidad consiste en acoplar los anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos se pueden detectar específicamente por medio de una segunda reacción. Por ejemplo, es común usar haptenos como la biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenol, piridoxal o fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos.

[0087] Por conveniencia, el anticuerpo de la presente invención se puede proporcionar en un kit, es decir, una combinación empaquetada de reactivos en cantidades predeterminadas con instrucciones para realizar el ensayo de diagnóstico. Cuando el anticuerpo está marcado con una enzima, el kit incluirá sustratos y cofactores requeridos por la enzima (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos tales como estabilizadores, tampones (p. ej., un tampón de bloque o tampón de lisis) y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, generalmente liofilizados, incluidos los excipientes que en la disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración apropiada.

[0088] Las formulaciones terapéuticas que comprenden uno o más anticuerpos de la invención se preparan para el almacenamiento mezclando el anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A.

Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. La composición de anticuerpos se formulará, dosificará y administrará de manera consistente con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de entrega del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del anticuerpo a administrar se regirá por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir la enfermedad asociada a CD47.

[0089] La dosis terapéutica puede ser al menos aproximadamente 0,01 mg por kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,05 mg por kg de peso corporal; al menos aproximadamente 0,1 mg por kg de peso corporal, al menos aproximadamente 0,5 mg por kg de peso corporal, al menos aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal, al menos aproximadamente 2,5 mg por kg de peso corporal, al menos aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal, a menos aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, y no más de aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal con una preferencia de 0,1 a 20 mg por kg de peso corporal. Un experto en la materia entenderá que tales pautas se ajustarán para el peso molecular del agente activo, p. ej., en el uso de fragmentos de anticuerpos, o en el uso de conjugados de anticuerpos. La dosificación también puede variarse para administración localizada, p. ej., intranasal, inhalación, etc., o para administración sistémica, p. ej., i.m., i.p., i.v. y similares.

[0090] El anticuerpo no necesita ser, pero está formulado opcionalmente con uno o más agentes que potencian la actividad, o que de otro modo aumentan el efecto terapéutico. Estos se usan generalmente en las mismas dosificaciones y con las rutas de administración que se usaron aquí anteriormente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis empleadas hasta ahora.

[0091] Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como metilo o propilo parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones iónicos formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (p. ej., complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0092] Los ingredientes activos también pueden quedar atrapados en una microcápsula preparada, p. ej., mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, p. ej., hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (p. ej., liposomas)., microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0093] El anticuerpo anti-CD47 se administra por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, subcutáneo, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo anti-CD47 se administra adecuadamente mediante infusión de pulso, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo.

[0094] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se definió anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos, terapia previa, el paciente historial clínico y respuesta al anticuerpo, y la discreción del médico tratante. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente al mismo tiempo o durante una serie de tratamientos.

[0095] En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un contenedor y una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, p. ej., botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales como vidrio o plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (p. ej., el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el anticuerpo anti-CD47. La etiqueta en, o asociada con, el contenedor indica que la composición se usa para tratar la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de paquetes con instrucciones de uso.

SECUENCIAS

[0096]

SEQ ID NO:1
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada; CDRl-Kabat
KYWMH

SEQ ID NO: 2
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada; CDR2-Kabat
EINPSDTYTNYNQKFKG

SEQ ID NO: 3
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada; CDR3-Kabat
VATMVARGFAY

SEQ ID NO: 4
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada; CDR1-IMGT
GYTFTKYW

SEQ ID NO: 5
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada; CDR2-IMGT
INPSDTYT

SEQ ID NO: 6
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARVATMVARGFAY

SEQ ID NO: 7
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera; CDRl-Kabat
KASQDVSGAVV

SEQ ID NO: 8
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera; CDR2-Kabat
LATYRYT

SEQ ID NO: 9
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera; CDR3-Kabat
QQYYSIPWT

SEQ ID NO: 10
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera; CDRl-IMGT
QDVSGA

SEQ ID NO: 11
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera; CDR2-IMGT
LATY

SEQ ID NO: 12
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera; CDR3-IMGT
QQYYSIPWT

SEQ ID NO: 13
VT008-AL6-14G1; Cadena pesada; CDRl-Kabat
NYWMY

SEQ ID NO: 14
VT008-AL6-14G1; Cadena pesada; CDR2-Kabat
WIDPNSGGTKYNEKFKS

SEQ ID NO: 15
VT008-AL6-14G1; Cadena pesada; CDR3-Kabat
GGYTMDY

SEQ ID NO: 16

VT008-AL6-14G1; Cadena pesada; CDRl-IMGT
GYTFTNYW

SEQ ID NO: 17
VT008-AL6-14G1; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IDPNSGGT

SEQ ID NO: 18
VT008-AL6-14G1; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARGGYTMDY

SEQ ID NO: 19
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera; CDRl-Kabat
RASQSLVHSNGNTYLH

SEQ ID NO: 20
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera; CDR2-Kabat
KVSNRFS

SEQ ID NO: 21
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera; CDR3-Kabat
SQSTHVPLT

SEQ ID NO: 22
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera; CDRl-IMGT
QSLVHSNGNTY

SEQ ID NO: 23
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera; CDR2-IMGT
KVSN

SEQ ID NO: 24
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera; CDR3-IMGT
SQSTHVPLT

SEQ ID NO: 25
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada; CDRl-Kabat
NYWIH

SEQ ID NO: 26
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada; CDR2-Kabat
RIDPNTVDAKYNEKFKS

SEQ ID NO: 27
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada; CDR3-Kabat
GGYTMDY

SEQ ID NO: 28
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada; CDRl-IMGT
GYTFINYW

SEQ ID NO: 29
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IDPNTVDA

SEQ ID NO: 30
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada; CDR3-IMGT
SRGGYTMDY

SEQ ID NO: 31
VT008-AL6-18K21; Cadena ligera; CDR1-Kabat
RSSQSLVHSNGNTYLH

SEQ ID NO: 32
VT008-AL6-18K21; Cadena ligera; CDR2-Kabat
KVSNRFS

SEQ ID NO: 33
VT008-AL6-18K21; Cadena ligera; CDR3-Kabat
FQSTHVPWT

SEQ ID NO: 34
VT008-AL6-18K21; Cadena ligera; CDRl-IMGT
QSLVHSNGNTY

SEQ ID NO: 35
VT008-AL6-18K21; Cadena ligera; CDR2-IMGT
KVSN

SEQ ID NO: 36
VL008-AL6-18K21; Cadena ligera; CDR3-IMGT
FQSTHVPWT

SEQ ID NO: 37
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada; CDRl-Kabat
DYYIN

SEQ ID NO: 38
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada; CDR2-Kabat
WIFPGSGLTYYNKKFKG

SEQ ID NO: 39
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada; CDR3-Kabat
PYYGSRWDYAMDY

SEQ ID NO: 40
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada; CDR1-IMGT
VYTFTDYY

SEQ ID NO: 41
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IFPGSGLT

SEQ ID NO: 42
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARPYYGSRWDYAMDY

SEQ ID NO: 43
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera; CDRl-Kabat
KSSQSLLNSNNQKNYLA

SEQ ID NO: 44
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera; CDR2-Kabat
FASTRES

SEQ ID NO: 45
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera; CDR3-Kabat
QQHYTTPYT

SEQ ID NO: 46
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera; CDR1-IMGT
QSLLNSNNQKNY

SEQ ID NO: 47
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera; CDR2-IMGT
FAST

SEQ ID NO: 48
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera; CDR3-IMGT
QQHYTTPYT

SEQ ID NO: 49

VL008-AL18-14G4; Cadena pesada; CDR1-Kabat
DYYIN

SEQ ID NO: 50
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada; CDR2-Kabat
RIYPGIGNTYYNKKFKG

SEQ ID NO: 51
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada; CDR3-Kabat
GHYGRGMDY

SEQ ID NO: 52
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada; CDR1-IMGT
GYSFTDYY

SEQ ID NO: 53
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IYPGIGNT

SEQ ID NO: 54
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARGHYGRGMDY

SEQ ID NO: 55
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDRl-Kabat
KSSQSLLNSIDQKNYLA

SEQ ID NO: 56
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR2-Kabat
FASTKES

SEQ ID NO: 57
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR3-Kabat
QQHYSTPWT

SEQ ID NO: 58
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR1-IMGT
QSLLNSIDQKNY

SEQ ID NO: 59
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR2-IMGT
FAST

SEQ ID NO: 60
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR3-IMGT
QQHYSTPWT

SEQ ID NO: 61
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada; CDRl-Kabat
TYWMH

SEQ ID NO: 62
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada; CDR2-Kabat
MIHPNSGTTNYNEKFKS

SEQ ID NO: 63
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada; CDR3-Kabat
SHYYDGHFSY

SEQ ID NO: 64
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada; CDR1-IMGT
GYTFTTYW

SEQ ID NO: 65
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IHPNSGTT

SEQ ID NO: 66
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada; CDR3-IMGT
TRSHYYDGHFSY

SEQ ID NO: 67
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera; CDRl-Kabat
KSSQSLLNSRTRKNYLA

SEQ ID NO: 68
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera; CDR2-Kabat
WASTRES

SEQ ID NO: 69
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera; CDR3-Kabat
KQSYNLWT

SEQ ID NO: 70
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera; CDRl-IMGT
QSLLNSRTRKNY

SEQ ID NO: 71
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera; CDR2-IMGT
WAST

SEQ ID NO: 72
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera; CDR3-IMGT
KQSYNLWT

SEQ ID NO: 73
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada; CDRl-Kabat
NYWIH

SEQ ID NO: 74
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada; CDR2-Kabat
RIDPNSGGTKYNEKFKS

SEQ ID NO: 75
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada; CDR3-Kabat
GGYTMDY

SEQ ID NO: 76
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada; CDRl-IMGT
GYTFTNYW

SEQ ID NO: 77
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IDPNSGGT

SEQ ID NO: 78
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARGGYTMDY

SEQ ID NO: 79
VT008-AL6-10K1; Cadena ligera; CDRl-Kabat
RSSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID NO: 80
VT008-AL6-10K1; Cadena ligera; CDR2-Kabat
KVSYRFS

SEQ ID NO: 81
VT008-AL6-10K1; Cadena ligera; CDR3-Kabat
FQSTHVPWT

SEQ ID NO: 82

VT008-AL6-10K1; Cadena ligera; CDR1-IMGT
QSLLHSNGNTY

SEQ ID NO: 83
VT008-AL6-10K1; Cadena ligera; CDR2-IMGT
KVSY

SEQ ID NO: 84 VT008-AL6-10K1; Cadena ligera; CDR3-IMGT
FQSTHVPWT

SEQ ID NO: 85
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada; CDRl-Kabat
NYWIY

SEQ ID NO: 86
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada; CDR2-Kabat
YINPRSDDTKYNQKFRD

SEQ ID NO: 87
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada; CDR3-Kabat
GGFTMDF

SEQ ID NO: 88
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada; CDR1-IMGT
GYTFINYW

SEQ ID NO: 89
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada; CDR2-IMGT
INPRSDDT

SEQ ID NO: 90
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARGGFTMDF

SEQ ID NO: 91
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera; CDRl-Kabat
RSSQSLLHSNGNTYLH

SEQ ID NO: 92
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera; CDR2-Kabat
KVSYRFS

SEQ ID NO: 93
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera; CDR3-Kabat
SQGTHVPYT

SEQ ID NO: 94
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera; CDR1-IMGT
QSLLHSNGNTY

SEQ ID NO: 95
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera; CDR2-IMGT
KVSY

SEQ ID NO: 96
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera; CDR3-IMGT
SQGTHVPYT

SEQ ID NO: 97
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada; CDRl-Kabat
GYNIY

SEQ ID NO: 98
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada; CDR2-Kabat
YIYPYNGISSYNQKFKD

SEQ ID NO: 99
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada; CDR3-Kabat
GGYTMDY

SEQ ID NO: 100
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada; CDR1-IMGT
GYSFTGYN

SEQ ID NO: 101
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IYPYNGIS

SEQ ID NO: 102
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARGGYTMDY

SEQ ID NO: 103
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera; CDRl-Kabat
RSSQSLVKSNGNTYLH

SEQ ID NO: 104
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera; CDR2-Kabat
KVSNRFS

SEQ ID NO: 105
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera; CDR3-Kabat
SQTTHVPYT

SEQ ID NO: 106
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera; CDRl-IMGT
QSLVKSNGNTY

SEQ ID NO: 107
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera; CDR2-IMGT
KVSN

SEQ ID NO: 108
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera; CDR3-IMGT
SQTTHVPYT

SEQ ID NO: 109
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada; CDR1-Kabat
DYYIN

SEQ ID NO: 110
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada; CDR2-Kabat
WIFPGSGLTYYNKKFKG

SEQ ID NO: 111
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada; CDR3-Kabat
PYYGSRWDYTMDY

SEQ ID NO: 112
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada; CDR1-IMGT
GYTFTDYY

SEQ ID NO: 113
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada; CDR2-IMGT
IFPGSGLT

SEQ ID NO: 114
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada; CDR3-IMGT
ARPYYGSRWDYTMDY

SEQ ID NO: 115
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera; CDRl-Kabat
KSSQNLLNSNNQKNHLA

SEQ ID NO: 116
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera; CDR2-Kabat
FASTRES

SEQ ID NO: 117
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera; CDR3-Kabat
QQHYTTPYT

SEQ ID NO: 118
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera; CDR1-IMGT
QNLLNSNNQKNH

SEQ ID NO: 119
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera; CDR2-IMGT
FAST

SEQ ID NO: 120
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera; CDR3-IMGT
QQHYTTPYT

SEQ ID NO: 121
VT008-AL5-10G7; Cadena pesada de región variable

QVQLQQPGAELVMPGSSVKLSCKTSGYTFTKYWMHWVKRRPGQGLEWIGEINPSDTYT
NYNQKFKGKSTLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARVATMVARGFAYWGQGTL
VTVSA

SEQ ID NO: 122
VT008-AL5-10K7; Cadena ligera de región variable

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSrrCKASQDVSGAVVWYQEKPGQSPNLLIYLATYRYTGV
PDRFTGSGSGTDFTLTIRSVQAEDMAVYYCQQYYSIPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 123
VT008-AL6-14G1; Cadena pesada de región variable

QVQLQQPGAELVKPGASLRVSCKASGYTFTNYWMYWVRQRPGRGLEWIGWIDPNSGG
TKYNEKFKSKATLTVDKPSSTAYMQLSSLTSEDSAVYNCARGGYTMDYWGQGTSVTV
SS

SEQ ID NO: 124
VT008-AL6-16K1; Cadena ligera de región variable

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRASQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 125
VT008-AL6-18G1; Cadena pesada de región variable

QVQLQQPGAELVKPGTSVKLSCKASGYTFINYWffIWVKQRPGRGLEWIGRIDPNTVDA
KYNEKFKSKATLTVDKPSSIAYMQLSSLTSEDSAVYYCSRGGYTMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 126
VT008-AL6-18K21; Cadena ligera de región variable

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPTLLIYKVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCFQSTHVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 127
VL008-AL17-7G1; Cadena pesada de región variable

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASVYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWVGWIFPGSGLT
YYNKKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARPYYGSRWDYAMDYWGQG
TSVTVSS

SEQ ID NO: 128
VL008-AL17-7K6; Cadena ligera de región variable

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLLYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYTTPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 129
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada de región variable

QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTDYYINWVKQRPGQGLEWIARIYPGIGNTY
YNKKFKGKATLTAEKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGHYGRGMDYWGQGTSVTV SS

SEQ ID NO: 130
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera de región variable

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 131
VL008-AL13-8G5; Cadena pesada de región variable

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTTYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSGT
TNYNEKFKSKATLTVDKSSSSTYMQLSSLTSEDSAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTLV TVSA

SEQ ID NO: 132
VL008-AL13-8K3; Cadena ligera de región variable

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO: 133
VT008-AL6-10G3; Cadena pesada de región variable

QVQLQQPGPELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWIHWLNQRPGRGLEWIGRIDPNSGGT
KYNEKFKSKAILTVDKSSSTTYMQLSSLTSEDSAVYYCARGGYTMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 134
VT008-AL6-10K1; Cadena ligera de región variable

DVVMPQTPLSLPVSLGDHASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSYRF
SGVPDRISGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCFQSTHVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 135
VT008-AL6-20G7; Cadena pesada de región variable

QVQLQQSGTELAKPGASVKLSCKASGYTFINYWIYWVKERPGQVLEWIGYINPRSDDTK
YNQKFRDRATLTADKSSTTAYLQLNSLTNDDSALYYCARGGFTMDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 136
VT008-AL6-20K7; Cadena ligera de región variable

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLLHSNGNTYLHWYLQKPGQSPNLLIYKVSYRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQGTHVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 137
VT008-AL6-39G2; Cadena pesada de región variable

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYNIYWVKQSHGNILDWIGYIYPYNGISSY
NQKFKDKATLTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARGGYTMDYGGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 138
VT008-AL6-39K2; Cadena ligera de región variable

DVVMTQTPLSLPVSLGEQASISCRSSQSLVKSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYFCSQTTHVPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 139
VL008-AL17-8G5; Cadena pesada de región variable

LVQLQQSGPELVKPGTSVKISCRSSGYTFTDYYINWVQQRPGQGLEWVGWIFPGSGLTY
YNKKFKGKATLSVDKSSNTAYMLLSSLTSEDSAVYFCARPYYGSRWDYTMDYWGQGT
SVTVS

SEQ ID NO: 140
VL008-AL17-8K7; Cadena ligera de región variable

DIVMTQSPSSLTMSVGQKATMSCKSSQNLLNSNNQKNHLAWYQQKPGQSPKLLLYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYTTPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 141
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada de la región variable humanizada; VH1

QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGYSFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGRIYPGIGNTY
YNKKFKGRAKLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLVTV
SS

SEQ ID NO: 142
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada de la región variable humanizada; VH2

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGN
TYYNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLV
TVSS

SEQ ID NO: 143
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada de la región variable humanizada; VH3

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGN
TYYNKKFKGRVTVTRDTSISTAHMELSSLRSDDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTAV
TVSS

SEQ ID NO: 144
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada de la región variable humanizada; VH4

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGNT
YYNKKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTTVT
VSS

SEQ ID NO: 145
VL008-AL18-14G4; Cadena pesada de la región variable humanizada; VH5

TYYNKKFKGRVTMTRYTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCARGHYGRGMDYWGQGTTV
TVSS

SEQ ID NO: 146
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 147
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 148
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL3

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYFASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 149

VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL4

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGAKVEIK

SEQ ID NO: 150
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL5

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGTKVEIR

SEQ ID NO: 151
Antígeno CD47 (antígeno relacionado con Rh, transductor de señal asociado a integrina), isoforma CRA_b [Homo sapiens], acceso: EAW79734,1

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKW
KFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVT
ELTREGETIIELKYRVVSWFSPNENILIVIFPIFAILLFWGQFGIKTLKYRSGGMDEKTIALL
VAGLVITVIVIVGAILFVPGEYSLKNATGLGLIVTSTGILILLHYYVFSTAIGLTSFVIAILVI
QVIAYILAVVGLSLCIAACIPMHGPLLISGLSILALAQLLGLVYMKFVASNQKTIQPPRKA
VEEPLNAFKESKGMMNDE

SEQ ID NO: 152
VT008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR2-Kabat; Epítopo de células T CD4+ corregido
YASTKES

SEQ ID NO: 153
VT008-AL18-14K1; Cadena ligera; CDR2-IMGT; Epítopo de células T CD4+ corregido
YAST

SEQ ID NO: 154
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera de región variable; Epítopo de células T CD4+ corregido

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYYAS
TKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 155
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL1; Epítopo de células T CD4+ corregido

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTK

SEQ ID NO: 156
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL2; Epítopo de células T CD4+ corregido

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGQGTK:

SEQ ID NO: 157
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL3; Epítopo de células T CD4+ corregido

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYYASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTK

SEQ ID NO: 158
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL4; Epítopo de células T CD4+ corregido

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGAKVEIK

SEQ ID NO: 159
VL008-AL18-14K1; Cadena ligera humanizada de región variable; VL5; Epítopo de células T CD4+ corregido

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGTKVEIR

SEQ ID NO: 160
hu-sCD47-6His; dominio extracelular del antígeno CD47 humano con etiqueta 6His

MWPLVAALLLGSACCGSAQLLFNKTKSVEFTFCNDTVVIPCFVTNMEAQNTTEVYVKW
KFKGRDIYTFDGALNKSTVPTDFSSAKIEVSQLLKGDASLKMDKSDAVSHTGNYTCEVT
ELTREGETIIELKYRVVSWFSPASSSGSSSHHHHHH

SEQ ID NO: 161
hu-IgG4 S228P; mutante IgG4 S228P de cadena pesada de región constante humana

GCTAGCACCAAGGGCCCCTCTGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCG
AATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAG
TGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTCCCTGCTGTGCTGC
AGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG
CACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACA
AGAGAGTGGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAATTTC
TGGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCT
CCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAAGATCCCGAG
GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAGCC
TCGGGAAGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA
CCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGC
CCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCCAG
GTGTACACACTGCCTCCATCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
CTGTCTCGTGAAGGGATTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGG
CCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTT
CTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC
TCTGTCCCTGGGCAAG

SEQ ID NO: 162
huIgG4_S228P; mutante IgG4 S228P de cadena pesada de región constante humana

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 163
hu-IgG4 S228P-L235E; región constante humana mutante de cadena pesada IgG4 S228P-L235E

GCTAGCACCAAGGGCCCCTCTGTGTTTCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGGTCCACCTCCG
AATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGAAAGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAG
TGTCCTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCATACCTTCCCTGCTGTGCTGC
AGTCCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCCGTCGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGG
CACCAAGACCTATACCTGCAACGTGGACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACA
AGAGAGTGGAATCTAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCTTGTCCTGCCCCTGAATTTG
AAGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCT
CCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAAGATCCCGAG
GTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAGCC
TCGGGAAGAACAGTTCAACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCA
CCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGC
CCAGCTCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCCAG
GTGTACACACTGCCTCCATCCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGAC
CTGTCTCGTGAAGGGATTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGG
CCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCCTGTACTCTCGCCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTGTT
CTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC
TCTGTCCCTGGGCAAG

SEQ ID NO: 164
huIgG4_S228P-L235E; región constante humana mutante de cadena pesada IgG4 S228P-L235E

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 165
h20-H2-L5Y; cadena pesada en formato huIgG4_S228P

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGN
TYYNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 166
h20-H2-L5Y; cadena pesada en formato hu-IgG4_S228P-L325E

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGRIYPGIGN
TYYNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGHYGRGMDYWGQGTLV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

SEQ ID NO: 167
h20-H2-L5Y; Cadena ligera

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYYASTK
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYSTPWTFGGGTKVEIRRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 168
VL008-AL13-8G5; cadena pesada de la región variable humanizada; VH1m

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVHQAPGQRLEWMGMIHPNSG
TTNYNQKFQGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 169
VL008-AL13-8G5; cadena pesada de la región variable humanizada; VH2m

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSG
TTNYNQKFQGRVTMTVDKSASTAYMELSSLRSEDSAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 170
VL008-AL13-8G5; cadena pesada de la región variable humanizada; VH3

QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSG
TTNYNEKFKSRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTL VTVSS

SEQ ID NO: 171
VL008-AL13-8G5; cadena pesada de la región variable humanizada; VH4

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTTYWMHWVRQAPGQGLEWMGMIHPNSG
TTNYNEKFKSRVTLTRDTSISTAYMELSRLTSDDTAVYYCTRSHYYDGHFSYWGQGTM
VTVSS

SEQ ID NO: 172
VL008-AL13-8K3; cadena ligera humanizada de región variable; VL1

DIVMTQSPGSLAVSLGERATFNCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGTKVEVK

SEQ ID NO: 173
VL008-AL13-8K3; cadena ligera humanizada de región variable; VL2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 174
VL008-AL13-8K3; cadena ligera humanizada de región variable; VL3

EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKAGQSPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 175
VL008-AL13-8K3; cadena ligera humanizada de región variable; VL4

DIVMTQSPDSLPVSLGERATINCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISALQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTRLEIK

SEQ ID NO: 176
Región constante de la cadena ligera kappa humana

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

EJEMPLOS

I. Generación de anticuerpos anti-CD47 de ratón

1. Inmunización de ratones.

[0097] Para generar anticuerpos de ratón contra CD47 humano (hCD47) y potencialmente con reacción cruzada con ratón CD47 (mCD47), se inmunizaron ratones de tipo salvaje NMRI o CD47-KO (C57BL6) de la siguiente manera con un protocolo de 4 inyecciones de ADN a las 2 semanas intervalos seguidos de dos refuerzos finales a intervalos de una semana con ADN CD47 o células CHO transfectadas con un vector de expresión CD47:

- (5) ratones WT: Cebar ADN CD47 humano + Impulsar ADN CD47 humano
- (3) ratones CD47 -/-: Cebar ADN CD47 humano + Impulsar CD47 CHO murino
- (3) ratones CD47 -/-: Cebar CD47 CHO murino + Impulsar CD47 CHO murino

[0098] El sacrificio de los animales se llevó a cabo de acuerdo con los resultados de detección en suero. La presencia y el título de la unión de IgG a CD47 humano o de ratón se monitorizó en los sueros de animales inmunizados usando un ELISA (recubrimiento de proteína de fusión hCD47-IgG1 humano, hCD47-Fc, o de proteína de fusión mCD47-IgG1 humano, mCD47-Fc) y por citometría de flujo en células CHO estables que expresan hCD47 o mCD47 (obtenidas después de la transfección con un vector que codifica hCD47 o mCD47, seguido de la selección de clones estables que expresan CD47, no mostrados). Se sacrificaron los animales que mostraban fuertes títulos de IgG anti-CD47. Se extrajeron sus bazos y ganglios linfáticos y las células mononucleares (MNC) se purificaron y congelaron.

2. Detección de células B individuales utilizando la tecnología ISAAC y generación de anticuerpos anti-CD47 recombinantes

[0099] La tecnología ISAAC, descrita en el documento WO2009/017226, es un método único para detectar células secretoras de anticuerpos individuales usando chips de microarrays, que permite el análisis de células vivas en una sola célula y ofrece un sistema rápido, eficiente y de alto rendimiento (hasta 234.000 células individuales) para identificar y recuperar las células relevantes.

[0100] Se preparó una matriz de células vivas individuales aplicando MNC de ratón, previamente purificadas de bazo y ganglios linfáticos de ratones inmunizados, a un chip de microarrays. La superficie del chip estaba previamente recubierta con el antígeno diana (proteína de fusión hCD47-IgG1 humano, hCD47-Fc) y los anticuerpos de ratón anti-CD47 secretados por una célula secretora de anticuerpos fueron atrapados por el CD47 recubierto en la superficie alrededor del pozo. Después de los lavados, la presencia de IgG de ratón unida al CD47 inmovilizado se detectó mediante un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a Cy3 y microscopio fluorescente. La unión del antígeno a los

anticuerpos específicos formaba puntos circulares distintos, que se distinguían fácilmente de las señales inespecíficas. Las células individuales secretoras de anticuerpos específicas de CD47 se recuperaron por micromanipulación, el ARNm se recuperó de células individuales y las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) de IgG se amplificaron por RT-PCR. Las secuencias VH y VL se clonaron luego en vectores de expresión que contenían una región constante gamma-2a de ratón (Fcy2a) y una región constante kappa o lambda, respectivamente. Después de la co-transfección de los vectores de expresión de las cadenas H y L en células CHO, el anticuerpo recombinante se purificó en una columna de proteína A de los sobrenadantes celulares y se analizó la confirmación del reconocimiento y especificidad de CD47 por ELISA en placas recubiertas con hCD47-Fc o mCD47-Fc y por citometría de flujo en células CHO transfectadas o no con hCD47 o mCD47.

[0101] En total, se identificaron 55 anticuerpos, de los cuales 34 (pertenecientes a 18 familias de líneas germinales diferentes) fueron producidos y purificados. De esos 34 anticuerpos, 19 reconocieron solo CD47 humano, 1 anticuerpo reconoció solo CD47 de ratón y 14 anticuerpos reconocieron tanto CD47 humano como de ratón.

II. Secuencias de los candidatos anti-CD47

[0102] Las tablas 1 a 3 (*supra*) hacen referencia a las secuencias de aminoácidos de los 10 candidatos seleccionados. En las secuencias enumeradas, los CDR se identifican de acuerdo con la anotación Kabat e IMGT.

III. Caracterización *in vitro* de anticuerpos recombinantes anti-CD47 de ratón

1. Ensayo de unión a CD47 por ELISA

[0103] Se probó la capacidad de todos los anticuerpos para unirse a hCD47-Fc recombinante y mCD47-Fc recubiertos en placas ELISA. Entre los 34 anticuerpos purificados probados, 19 reconocieron solo hCD47, 1 anticuerpo reconoció solo mCD47 y 14 anticuerpos reconocieron tanto CD47 humano como de ratón (datos no mostrados).

2. Ensayo de unión a CD47 por citometría de flujo en células CHO transfectadas con CD47 y reactividad cruzada con CD47 de ratón y cynomolgus.

[0104] La capacidad de los anticuerpos anti-CD47 de ratón identificados para reconocer la proteína celular CD47 humana expresada en la membrana celular así como la proteína CD47 de otras especies se analizó adicionalmente mediante citometría de flujo usando células CHO que expresan establemente el antígeno CD47 de primate humano, origen de ratón o no humano. (mono cynomolgus). La expresión del CD47 específico de la especie en la superficie celular CHO se validó usando tinción con anticuerpos anti-CD47 apropiados y citometría de flujo en células no fijadas. El anticuerpo B6H12 (IgG1 de ratón, Abcam) se usó para confirmar la expresión de CD47 de humanos y cynomolgus, MIAP301 (IgG2a de rata, BD Biosciences) para verificar la expresión de CD47 de ratón y MEM122 (IgM de ratón, abcam) para la expresión de CD47 de mono.

[0105] Los anticuerpos anti-CD47 y los anticuerpos de control de isotipo se incubaron a diversas concentraciones de 7 µg/ml a 3,3 ng/ml con células CHO que expresan diferentes especies de CD47 a +4°C durante 30 minutos. Después de 2 lavados, la presencia del anticuerpo unido a la membrana celular CD47 se reveló por incubación con un anticuerpo IgG anti-ratón o anti-humano acoplado a PE dependiendo del isotipo del anticuerpo primario y análisis en un citómetro de flujo Accuri-C6 (BD Biosciences). Las diferencias entre la intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida para cada concentración de anticuerpo y la intensidad obtenida en ausencia de anticuerpo primario (delta-IFM), se calcularon y se representaron gráficamente frente a las concentraciones de anticuerpos. Los anticuerpos de control negativo de isotipo apropiado (mIgGl, mIgG2a, hIgGl, hIgG4) que no reconocieron CD47 se analizaron en las mismas condiciones para medir la tinción de anticuerpos de fondo (tinción inespecífica)

[0106] También se probaron diferentes anticuerpos de referencia anti-hCD47 en paralelo con nuestros candidatos. Los incluidos, el ratón B6H12, el 5F9 quimérico (c5F9) y los anticuerpos humanizados 5F9 (hu5F9; vh2-vl2) forman la Universidad de Stanford (WO2011/143624); el anticuerpo 2A1 de ratón y su variante humanizada AB06,12 de Inhibrx (US2013/0224188; WO2014/123580); el anticuerpo 5A3M3 de ratón de Novimmune (WO2014/087248); y el anticuerpo VxP037-01LCL de ratón de Frazier et al. (WO2014/093678).

[0107] Los resultados obtenidos para 10 anticuerpos anti-CD47 de ratón se resumen en la Tabla 4 a continuación, y se comparan con los resultados obtenidos con los anticuerpos de referencia. Los 10 candidatos anti-CD47 de ratón se unieron fuertemente a las células CHO que expresan el CD47 humano y cynomolgus, pero no a las células CHO no transfectadas. Además, 5 de los candidatos (candidatos 14, 15, 26, 29 y 30) también se unieron fuertemente a las células CHO que expresan el CD47 de ratón, mientras que los otros 5 anticuerpos no lo hicieron. Estos resultados mostraron que 5 anticuerpos reconocieron específicamente CD47 de origen humano y de cynomolgus (candidatos 7, 19, 20, 22 y 33) y que otros 5 anticuerpos también reaccionaron de forma cruzada contra el CD47 de origen de ratón (candidatos 14, 15, 26, 29, 30), lo que sugiere el reconocimiento de diferentes epítopos por esos anticuerpos.

[0108] Como se informó, los puntos de referencia 2A1 y B6H12 reconocieron el hCD47 y reaccionaron de forma cruzada con cynoCD47 pero no con mCD47, mientras que el anticuerpo VxP037-01LCl reaccionó de forma cruzada

contra CDn de cynomolgus y de ratón, así como posiblemente contra CD47 de hámster expresado en células de CHO de tipo salvaje.

Tabla 4: Resumen de reactividad cruzada de anticuerpos anti-CD47

Anticuerpo	CHO	CHO-hCD47	CHO-mCD47	CHO-cynoCD47
B6H12	-	++	-	+++
c5F9	-	+++	-	+++
hu5F9	-	+++	-	+++
5A3M3	-	++	-	++
2A1	-	+++	-	+++
AB06,12	-	+++	-	+++
VxP037-01LC1	++	+++	+++	+++
Candidato 7	-	+++	-	+++
Candidato 14	+	+++	+++	+++
Candidato 15	+	+++	+++	+++
Candidato 26	+/-	+++	+++	+++
Candidato 19	-	+++	-	+++
Candidato 33	-	+++	-	+++
Candidato 20	+/-	+++	+/-	+++
Candidato 22	+/-	+++	-	+++
Candidato 29	-	+++	+++	+++
Candidato 30	+/-	+++	+++	+++
-; +/-; +; ++; +++ que van desde la detección "no" a la detección "fuerte"				

3.Inhibición de la interacción CD47/SIRPα por ELISA

[0109] Se probó la capacidad de los anticuerpos para interrumpir la interacción CD47-SIRPα mediante ELISA. El día antes del experimento, la proteína de fusión hCD47-hIgG1 se revistió en el fondo de placas de 96 pocillos y se incubó durante la noche a 4°C. Los pocillos se lavaron y saturaron durante dos horas a temperatura ambiente. Después de los pasos de lavado, el antígeno (proteína de fusión hSIRPα-6HIS, Gentaur), así como los anticuerpos a analizar, se agregaron en cada pocillo y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Después de los lavados, se detectó la presencia o no de la SIRPα interactuante mediante un anticuerpo secundario anti-6His conjugado con HRP (Betilo) y sustrato de peroxidasa. Se encontró que los 10 anticuerpos seleccionados inhibían la unión de hSIRPα a hCD47 (datos no mostrados).

4. Inhibición de la interacción CD47/SIRPα por citometría de flujo en células CHO

[0110] Los ocho mejores candidatos se seleccionaron luego de acuerdo con su perfil de unión mediante ELISA y en células CHO transfectadas con CD47 (candidatos 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26, 33) y se evaluó su capacidad para inhibir la unión de SIRPα humano (hSIRPα) a hCD47 expresado en células CHO. Las células transfectadas con CD47 humano (3×10^5 células/pocillo de placa de 96 pocillos) se incubaron primero a +4°C durante 30 minutos con diluciones en serie de anticuerpos anti-CD47 o anticuerpo de control de isotipo (en formato mIgG2a o mIgGl). Las células se lavaron e incubaron con 10 µg/ml de hSIRPα marcado con His (His-hSIRPα, Gentaur) durante 30 minutos a +4°C. Después de los lavados, la unión de His-hSIRPα a las células CHO se reveló por incubación con un anticuerpo anti-His de conejo (Betilo), seguido de un IgG anti-conejo de cabra conjugado con FITC (BD Biosciences) y análisis de citometría de flujo en un citómetro de flujo Accuri-C6 (BD Biosciences).
El porcentaje de inhibición de la unión de hSIRPα a hCD47 se calculó de la siguiente manera:
% de inhibición = (l-(IFM_wAb - IFM_wohSIRPα)/(IFM_whSIRPα - IFM_wohSIRPα))x100, donde IFM_wAb es la fluorescencia de intensidad media (IFM) obtenida con las células hCD47-CHO incubadas con el anticuerpo probado y hSIRPα; IFM_wohSIRPα es la IFM obtenida en ausencia de hSIRPα (100% de inhibición de unión de hSIPRa); y IFM_whSIRPα es la fluorescencia con hSIRPα pero sin preincubación con anticuerpo (0% de inhibición de unión a SIRPα). El porcentaje de inhibición se trazó contra la concentración de anticuerpos y los valores de CI50 se calcularon usando un modelo de análisis de regresión no lineal del software GraphPad Prism.
Los resultados presentados en la Figura 1 y la Tabla 5 a continuación muestran que los 8 candidatos seleccionados (números 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 y 33) inhibieron fuertemente la unión de hSIRPα en hCD47 expresado en células CHO, con Valores de CI50 que varían de 0,36 a 1,10 µg/ml (2,4 a 7,3 nM). Los 8 candidatos anti-CD47 fueron superiores a los anticuerpos B6H12 y 5A3M3 y fueron similares a los anticuerpos 2A1 y VxP037-01LCL.

Tabla 5: Valores CI50 de anticuerpos anti-CD47 en el ensayo de inhibición CD47/SIRPα con células CHO

transfectadas con CD47 y análisis de citometría de flujo (valores medios de n experimentos independientes)

Anticuerpo (formato mIgG)	CI50 media (µg/mL)	n
B6H12	4,920	7
2A1	0,739	7
VxP037-01LC1	0,759	6
5A3M3	4,798	4
Candidato 7	0,657	6
Candidato 14	0,737	5
Candidato 15	0,605	5
Candidato 19	0,858	5
Candidato 20	0,440	2
Candidato 22	0,482	2
Candidato 26	0,359	4
Candidato 33	1,108	4

5. Unión de anticuerpos anti-CD47 en hCD47 expresados por células Raji

[0111] Los otros ocho candidatos seleccionados (números 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26, 33) fueron evaluados por su capacidad de unirse a hCD47 expresado en la línea celular de linfoma B humano Raji. Las células Raji (ATCC-CLL-86; 2 x 10^5 células/pocillo de placa de 96 pocillos) se incubaron primero a +4°C durante 30 minutos con diluciones en serie de anticuerpos anti-CD47 o anticuerpo de isotipo de control (en formato mIgG2a o mIgGl). Las células se lavaron luego y se incubaron durante 30 minutos a +4°C con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra F(ab)'2 conjugado con PE (dilución 1/100, Beckman Coulter). Después de los lavados, se analizó la fluorescencia de las células mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo Accuri-C6 (BD Biosciences).

[0112] El delta de IFM, que representa la diferencia entre la intensidad medida con el anticuerpo probado y la intensidad en ausencia de anticuerpo, se calculó para cada concentración de anticuerpo y los valores se representaron frente a las concentraciones de anticuerpo. Los valores de CE50 se calcularon utilizando un modelo de análisis de regresión no lineal del software GraphPad Prism.

[0113] Los resultados presentados en la Figura 2 y la Tabla 6 a continuación, muestran que los 8 candidatos (números 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 y 33) se unieron fuertemente a hCD47 expresado en células Raji, con valores de CE50 que van desde 0,03 a 0,17 µg/mL (0,2 a 1,1 nM). Los 8 candidatos anti-CD47 fueron superiores a los anticuerpos B6H12 y 5A3M3 y fueron similares a los anticuerpos 2A1 y VxP037-01 LCI de los competidores.

Tabla 6: Valores de CE50 de anticuerpos anti-CD47 en el ensayo de unión a CD47 con células Raji y análisis de citometría de flujo (valores medios de n experimentos independientes)

Anticuerpo (formato mIgG)	CI50 media (µg/mL)	n
B6H12	2,930	2
2A1	0,058	3
VxP037-01LC1	0,074	2
5A3M3	0,301	1
Candidato 7	0,058	2
Candidato 14	0,055	2
Candidato 15	0,031	2

(Continuación)

Anticuerpo (formato mIgG)	CI50 media (µg/mL)	n
Candidato 19	0,165	2
Candidato 20	0,096	3
Candidato 22	0,136	2
Candidato 26	0,070	2
Candidato 33	0,112	2

6. Inhibición de la interacción CD47/SIRPα por citometría de flujo en células Raji

[0114] Seis de los 8 candidatos seleccionados adicionalmente (números 14, 15, 19, 20, 22, 33) fueron evaluados por su capacidad para inhibir la unión de hSIRPα a hCD47 expresado en células Raji de linfoma B humano. Con este fin, las células Raji (ATCC-CCL-86; 2 x 10^5 células/pocillo de placa de 96 pocillos) se incubaron primero a +4°C durante 30 minutos con diluciones en serie de anticuerpos anti-CD47 o anticuerpo de control de isotipo (candidatos quiméricos anti-CD47 producidos en formato hIgGl o hIgG4). Luego se lavaron las células y se incubaron con 2,5 µg/ml de hSIRPα marcado con His (His-hSIRPα, Gentaur) durante 30 minutos a +4°C. Después de los lavados, se reveló la unión de His-hSIRPα a las células Raji mediante incubación con un anticuerpo anti-His de ratón (dilución 1/1000; Qiagen), seguido de una IgG anti-ratón de cabra conjugada con PE (dilución 1/100; Beckman Coulter) y análisis de citometría de flujo en un citómetro de flujo Accuri-C6 (BD Biosciences).

[0115] El porcentaje de inhibición de la unión de hSIRPα a hCD47 se calculó de la siguiente manera: % de inhibición = (1-(IFM_wAb - IFM_wohSIRPα)/(IFM_whSIRPα - IFM_wohSIRPα))x100, donde IFM_wAb es la fluorescencia de intensidad media (IFM) obtenida con las células Raji incubadas con el anticuerpo probado y hSIRPα; IFM_wohSIRPα es la IFM obtenida en ausencia de hSIRPα (100% de inhibición de unión de hSIPRa); y IFM_whSIRPα es la fluorescencia con hSIRPα pero sin preincubación con anticuerpo (0% de inhibición de unión a SIRPα). El porcentaje de inhibición se trazó contra la concentración de anticuerpos y los valores de CI50 se calcularon usando un modelo de análisis de regresión no lineal del software GraphPad Prism.

[0116] Los resultados presentados en la Figura 3 y la Tabla 7 a continuación muestran que los 6 candidatos seleccionados (números 14, 15, 19, 20, 22 y 33) inhibieron fuertemente la unión de hSIRPα en hCD47 expresado en células Raji, con valores de CI50 que van desde 0,021 a 0,369 µg/mL (0,14 a 2,46 nM). Los 6 candidatos anti-CD47 fueron similares o superiores a los anticuerpos quiméricos B6H12 y quiméricos 5F9, así como a los anticuerpos humanizados 5F9 y AB06,12.

Tabla 7: valores CI_{50} de anticuerpos anti-CD47 en el ensayo de inhibición hCD47/hSIRPα con células Raji y análisis de citometría de flujo (valores medios de n experimentos independientes)

Anticuerpo (formato hIgG)	CI50 media (µg/mL)	n
B6H12 quimérico	0,400	1
c5F9 quimérico	0,209	5
Hu5F9 humanizado	0,109	3
AB06,12 humanizado	0,082	4
Candidato 14	0,021	2
Candidato 15	0,021	2
Candidato 19	0,369	3
Candidato 20	0,110	6
Candidato 22	0,233	4
Candidato 33	0,110	3

7. Fagocitosis de células Raji por macrófagos humanos

[0117] CD47 se considera como una señal de "no me comas" que previene la fagocitosis de las células que expresan CD47 al interactuar con SIRPα expresado en células con actividad de fagocitosis como los macrófagos. Con el fin de evaluar la capacidad de los mejores candidatos para aumentar la fagocitosis de las células tumorales por los macrófagos, las células Raji de linfoma B humano se cargaron primero con éster de 5(6)-carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimidilo (CFSE, 2,5 µM, Abcam) y luego se incubaron con diferentes diluciones de anticuerpos anti-CD47 o anticuerpos de control (formato mIgGl). Luego se lavaron las células y se colocaron en presencia de macrófagos adherentes previamente diferenciados de los monocitos de sangre periférica humana en placas de 24 pocillos en presencia de 10 µg/ml de M-CSF (Peprotech) durante 9 días. Después de 4 horas de incubación a +37°C, las mezclas celulares se lavaron firmemente con STF frío y los macrófagos adherentes se fijaron con PFA. Las células fijas se examinaron bajo un microscopio fluorescente Axiovert 40FL (Zeiss) equipado con una lámpara HB050. Las imágenes de fluorescencia verde (células Raji) y campo brillante (macrófagos) se monitorizaron con una cámara digital AxioCam y se contó el número de células Raji (fluorescentes verdes) y macrófagos por campo utilizando el software de análisis de imagen ZEN lite. Luego se calculó un índice fagocítico como el número de células Raji ingeridas por 100 macrófagos.

[0118] Los resultados presentados en la Figura 4 y la Tabla 8 a continuación, muestran que los 8 candidatos seleccionados (números 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26 y 33) aumentaron la fagocitosis de las células Raji por los macrófagos humanos. A una concentración subóptima (0,125 µg/ml), los candidatos fueron superiores a los anticuerpos B6H12 y 5A3M3, y similares a los anticuerpos 2A1 y VxP037-01LCl.

Tabla 8: Índice fagocítico de anticuerpos anti-CD47 (a 0,125 µg/ml) en el ensayo fagocítico Raji con macrófagos humanos

Anticuerpo (formato mIgG1)	Media	DE	n
B6H12	33,1	31,3	7
2A1	112,8	39,9	5
VxP037-01LC1	88,4	28,9	4
5A3M3	29,9	4,4	2
Candidato 7	123,6	14,9	3
Candidato 14	78,9	39,3	5
Candidato 15	74,4	35,6	4
Candidato 19	73,9	16,8	3
Candidato 20	118,6	36,6	4
Candidato 22	105,8	55,5	4
Candidato 26	85,3	15,1	2
Candidato 33	71,4	27,7	3

8. Ensayo de aglutinación de glóbulos rojos

[0119] Los 8 candidatos preseleccionados fueron evaluados para determinar su capacidad de inducir la aglutinación de glóbulos rojos (RBC) humanos y se compararon con anticuerpos de referencia.

[0120] En la primera serie de experimentos, los glóbulos rojos purificados a partir de sangre periférica humana se incubaron con dilución en serie de anticuerpos anti-CD47 o anticuerpos de control durante 1 hora a 37°C en 96 placas con fondo en U. Después de la incubación, la evidencia de aglutinación de glóbulos rojos se demostró por la aparición de una neblina en lugar de un granulado rojo punteado de glóbulos rojos no aglutinados. Se midió el área de los gránulos de glóbulos rojos y se calculó el índice de hemaglutinación mediante la relación del área de glóbulos rojos a diferentes concentraciones de anticuerpos frente al área de glóbulos rojos sin anticuerpos, esencialmente como se describe en el documento WO2014/123580. Los índices de hemaglutinación se representaron frente a las concentraciones de anticuerpos, como se muestra en la Figura 5. Se encontró que los candidatos 14 y 15, y en menor medida el candidato 26, inducen una fuerte aglutinación de glóbulos rojos purificados. Es de destacar que estos 3 anticuerpos pertenecen a la misma familia de clones y reaccionan de forma cruzada con mCD47. En contraste, los candidatos 19, 20 y 33 no indujeron la aglutinación de glóbulos rojos purificados cuando se probaron en concentraciones que van desde 0,01 nM a 240 nM (~1,5 ng/mL a 36 µg/mL), como también se observó con el anticuerpo 2A1. Se encontró que los candidatos 7 y 22 inducen una aglutinación débil para una ventana estrecha de concentración, como también se observó con los anticuerpos VxP037-01LCl y B6H12. El anticuerpo 5A3M3 indujo la aglutinación de glóbulos rojos purificados solo a altas concentraciones.

[0121] En un segundo conjunto de experimentos, los 8 candidatos seleccionados fueron evaluados por su capacidad para inducir la aglutinación de glóbulos rojos humanos mediante el uso de glóbulos rojos no purificados de sangre periférica completa, esencialmente como se describe en el documento WO2014/087248. Con este fin, se incubó sangre periférica humana (dilución final 1/5) con diluciones en serie de anticuerpos anti-CD47 o anticuerpos de control durante la noche a 37°C en placas de 96 pocillos de fondo plano. Después de la incubación, las placas se agitaron suavemente, se inclinaron a aproximadamente 30° y se dejaron reposar durante 10 minutos. La evidencia de aglutinación de RBC se demostró por la aparición de un depósito agrupado en forma de media luna en el fondo alrededor del borde inferior del pozo. Se probaron diferentes formatos de los candidatos anti-CD47 y se compararon con anticuerpos de referencia. El candidato 20 en formato quimérico mIgGl o hIgGl no indujo la aglutinación de glóbulos rojos en el intervalo de concentraciones probadas de 0,023 a 50µg/mL (~0,15 a 330nM), como también se observó para anticuerpos 2A1 y AB06,12 (humanizados 2A1). Se observó una débil aglutinación de glóbulos rojos para concentraciones superiores a 16 µg/ml tanto para el candidato 20 como para el anticuerpo AB06,12 en formato hIgG4. En contraste, el 5F9 quimérico (c5F9) y el 5F9 humanizado (variante hu5F9, vh2/vl2) indujeron una aglutinación más fuerte cuando se probaron en formato hIgGl y hIgG4. La B6H12 quimérica indujo la aglutinación de glóbulos rojos en formato hIgGl pero más débilmente en el isotipo hIgG4.

[0122] En este ensayo con sangre completa, se encontró que los candidatos 19, 22 y 33 inducen la aglutinación de glóbulos rojos a concentraciones superiores a 5 µg/ml. Esta observación fue independiente del formato probado (mIgG o hIgG quimérico). Finalmente, los candidatos 14 y 15, y en menor medida los candidatos 7 y 26 indujeron una fuerte aglutinación de glóbulos rojos no purificados.

[0123] Los datos del ensayo de aglutinación de glóbulos rojos se resumen en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9: Actividad de aglutinación de glóbulos rojos de anticuerpos anti-CD47

Anticuerpo	Aglutinación RBC con				
	RBC purificado	Sangre entera			
	mIgG o hIgG	mIgG1	mIgG2a	hIgG1	hIgG4
B6H12	+/- (m, h)	+++	+++	+++	+/++
c5F9	Nd	nd	nd	+++	+++
hu5F9	Nd	nd	nd	+++	+++
5A3M3	+++ (m1)	+/-	nd	nd	nd
2A1	- (m1)	-	nd	nd	nd
AB06,12	Nd	nd	nd	-	+/-
VxP037-01LCl	+ (m1)	+	nd	nd	nd
Candidato 7	++ (m1, m2a)	++	++	nd	++
Candidato 14	++++ (m, h)	++++	++++	++++	++++
Candidato 15	+++ (m, h)	++++	++++	++++	+++
Candidato 26	++ (m2a)	nd	++	nd	++
Candidato 19	- (m1, m2a)	+++	++	+++	+/+++
Candidato 33	-	+++	+++	+++	+++
Candidato 20	-	-	-	-	+/-
Candidato 22	+/++	+++	+++	+++	+++
nd: no hecho; m: mIgG; m1: mIgG1; m2a: mIgG2a; h: hIgG +/-, se observa aglutinación débil a 50 µg/ml de anticuerpo solamente; +, aglutinación a 50 µg/ml de anticuerpo; ++, aglutinación para concentraciones ≥16,7 µg/mL; +++, aglutinación para concentraciones ≥5,6 µg/mL					

9. Afinidad de los mejores candidatos anti-CD47 de ratón

[0124] Las constantes cinéticas (Kon & Koff) y la constante de disociación (KD) de los candidatos anti-CD47 de ratón se midieron adicionalmente mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) en Biacore T200 (GE Healthcare) usando una preparación soluble del dominio extracelular CD47 humano marcado con una etiqueta 6His (SEQ ID NO: 160) (proteína hCD47-his) y se compara con los puntos de referencia. Brevemente, la afinidad de unión entre los anticuerpos y hCD47-his se midió utilizando el protocolo de cinética de ciclo único del instrumento Biacore T200 a + 20°C. Primero se inmovilizó una IgG (Fc) antihumana o anti-ratón en la superficie de los chips de sensor serie CM5 usando los kits de captura de anticuerpos humanos o de ratón y de acoplamiento de amina, siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Esto resultó en aproximadamente 10.000 unidades de respuesta (UR) inmovilizadas en la superficie. Los anticuerpos de ratón, quimerizados o humanizados a analizar se capturaron en la superficie de IgG anti-ratón o antihumana apropiada en todas las células de flujo, excepto la célula de flujo 1 utilizada como control, a la concentración y al tiempo de contacto ajustados para capturar ~300 RU en la superficie. La cinética de unión se estudió pasando concentraciones crecientes de hCD47-his en una serie de cinco inyecciones de 10 minutos a través de todas las células de flujo a una velocidad de 30 µL/min. Se utilizaron diluciones triples hasta una concentración máxima de 270 nM. Después de la inyección final, el tampón se pasó a través de cada célula de flujo durante 60 minutos (ratón) o 30 minutos (humano) para controlar la disociación del antígeno unido. La regeneración de la superficie de unión se llevó a cabo en el final del ciclo por el flujo de 3 M $MgCl_2$ durante 60 s en 20 µL/min seguido de 10 mM de glicina-HCl, pH 1,7 durante 180 s en 10 µl/min (para humanos) o haciendo fluir glicina-HCl 10 mM, ph 1,7 durante 360 s a 10 µl/min (para ratón). Se ejecutó un segundo ciclo con los mismos anticuerpos pero sin antígeno como control. Las constantes de unión cinética se estimaron mediante el ajuste no lineal de los datos del sensograma al modelo de unión 1:1 proporcionado por el software de evaluación Biacore T200. Los resultados se muestran en la Tabla 10 a continuación. Todos los candidatos mostraron una afinidad en el rango nM con un KD de entre 0,9 a 4,2 nM, excepto el candidato 22 que mostró una afinidad más débil, con un KD de 15,7 nM. Como se muestra en la Figura 6, todos los candidatos preseleccionados, excepto el candidato 33, diferían de los anticuerpos B6H12, 2A1 y VxP037-01 LCI al mostrar una cinética de disociación más rápida, con valores de Koff en el intervalo de 3,4 x 10^{-3} a 1,8 x 10^{-4} $s^{-1,}$ en comparación con 5,0 a 8,9 x 10^{-5} s^{-1} para B6H12, 2A1 y VxP037-01LCl.

Tabla 10: Cinética y constantes de afinidad de anticuerpos anti-CD47 por Biacore (valores medios de experimentos independientes)

Anticuerpo	KD (M)	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	N
B6H12	$5{,}14 \times 10^{-9}$	$1{,}29 \times 10^{4}$	$6{,}59 \times 10^{-5}$	7
VxP037-01LCl	$2{,}56 \times 10^{-10}$	$3{,}54 \times 10^{5}$	$8{,}87 \times 10^{-5}$	3
2A1	$1{,}27 \times 10^{-10}$	$4{,}01 \times 10^{5}$	$4{,}99 \times 10^{-5}$	4
Candidato 7	$1{,}94 \times 10^{-9}$	$1{,}90 \times 10^{5}$	$3{,}70 \times 10^{-4}$	2
Candidato 14	$3{,}85 \times 10^{-9}$	$8{,}74 \times 10^{5}$	$3{,}37 \times 10^{-3}$	2
Candidato 15	$4{,}24 \times 10^{-9}$	$5{,}65 \times 10^{5}$	$2{,}39 \times 10^{-3}$	2
Candidato 19	$2{,}25 \times 10^{-9}$	$7{,}90 \times 10^{4}$	$1{,}76 \times 10^{-4}$	4
Candidato 20	$4{,}16 \times 10^{-9}$	$1{,}01 \times 10^{5}$	$4{,}18 \times 10^{-4}$	4
Candidato 22	$1{,}57 \times 10^{8}$	$2{,}07 \times 10^{4}$	$3{,}25 \times 10^{-4}$	2
Candidato 26	$1{,}87 \times 10^{-9}$	$2{,}00 \times 10^{5}$	$3{,}72 \times 10^{-4}$	2
Candidato 33	$8{,}98 \times 10^{-10}$	$7{,}46 \times 10^{4}$	$6{,}70 \times 10^{-5}$	2

10. Liberación de anticuerpos anti-CD47 después de unirse a glóbulos rojos humanos o células tumorales, y fagocitosis de células tumorales por anticuerpos anti-CD47 de acuerdo con su valor de Koff

[0125] CD47 se expresa en las células sanguíneas circulantes, en particular en los glóbulos rojos, y representa una fuente importante de efecto sumidero que puede afectar significativamente la farmacocinética y la eficacia de un anticuerpo terapéutico anti-CD47 al reducir la cantidad de anticuerpo libre disponible para las células diana como las células tumorales. Además, una unión importante y prolongada de los anticuerpos anti-CD47 a los glóbulos rojos también puede aumentar el riesgo de toxicidad, como la anemia. La cinética de la unión frente a la liberación de un anticuerpo de su antígeno depende principalmente de su cinética de asociación y disociación que puede cuantificarse midiendo los valores de Kon y Koff, respectivamente, p. ej., por SPR como se lleva a cabo para los anticuerpos anti-CD47 de esta invención. Con el fin de evaluar *in vitro* el impacto de la cinética de disociación de los anticuerpos anti-CD47 en su liberación después de la unión a los eritrocitos, los eritrocitos humanos purificados se incubaron con 1 µg/ml de candidatos de ratón anti-CD47 14, 19, 20 o 22, o con 1 µg/ml de ratón anticuerpo anti-CD47 2A1 o B6H12. Estos candidatos anti-CD47 fueron seleccionados porque poseían valores de Koff superiores a $1 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ o incluso superiores a $1 \times 10^{-3}\ s^{-1}$ para el candidato 14 (ver Tabla 10). Por el contrario, el valor de Koff de los puntos de referencia anti-CD47 2A1 y B6H12 fue inferior a $1 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ (Tabla 10). Después de 30 minutos de incubación con anticuerpos a +4°C, los glóbulos rojos se lavaron, se resuspendieron en tampón STF/BSA/EDTA libre de anticuerpos y se incubaron a +37°C durante 6 horas o 24 horas. A diferentes tiempos de incubación, los glóbulos rojos se lavaron en tampón STF/BSA/EDTA y se incubaron con una IgG anti-ratón de cabra conjugada con PE a +4°C. La unión de los anticuerpos anti-CD47 de ratón a los glóbulos rojos se analizó adicionalmente mediante citometría de flujo. Para cada anticuerpo, se registró la intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida activando los glóbulos rojos viables después de 6 horas (T+6h) o 24 horas (T+24h) y se comparó con la IFM obtenida en los glóbulos rojos analizados justo antes de los períodos de incubación a +37°C (T0). Los resultados se expresaron como el porcentaje de disminución de la IFM registrada después de la incubación T+6h o T+24h a +37°C en comparación con la IFM registrada en T0 antes de los pasos de incubación.

[0126] Como se muestra en la Figura 20, la IFM de los glóbulos rojos teñidos con los candidatos 14, 19, 20 y 22 ya se redujo significativamente después de 6 horas y se redujo aún más después de 24 horas de incubación a +37°C. Estos resultados indicaron que los candidatos 14, 19, 20 y 22 se separaron progresivamente de los glóbulos rojos después de haberse unido al antígeno CD47 expresado en membrana. En contraste, después de 6 o 24 horas de incubación a +37°C, la IFM de los glóbulos rojos teñidos con el anticuerpo 2A1 o B6H12 no se modificó o solo débilmente, lo que indica que el anticuerpo 2A1 y B6H12 estaban fuertemente adheridos a los glóbulos rojos y no se liberaban o solo se liberaban lentamente en el medio extracelular.

[0127] Es de destacar que, aunque se observó una aglutinación con ciertos anticuerpos (candidatos 14 y 22, anticuerpo B6H12), esto no tuvo un fuerte impacto en el análisis de glóbulos rojos individuales por citometría de flujo.

[0128] Estos resultados sugieren que los anticuerpos anti-CD47, como los candidatos 14, 19, 20 y 22 que comparten una cinética de disociación con un alto valor de Koff superior a $1 \times 10^{-4}\ s^{-1,}$ se liberarán más rápidamente de los glóbulos rojos para alcanzar las células diana. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD47 como el candidato 14, 19, 20 y 22 estarán más disponibles para alcanzar el CD47 expresado en las células tumorales diana en comparación con los anticuerpos con cinética de disociación lenta como 2A1 o B6H12 que poseen un valor Koff inferior a $1 \times 10^{-4}\ s^{-1}$.

[0129] Por el contrario, un anticuerpo con una alta tasa de disociación del CD47 expresado en células puede ser menos eficiente para mejorar la fagocitosis de células tumorales que los anticuerpos con una tasa de disociación más lenta. Para abordar este punto, se realizó un experimento, similar al experimento de unión/liberación realizado anteriormente en los glóbulos rojos, para medir la liberación *in vitro* de los anticuerpos anti-CD47 por las células tumorales y su efecto sobre la fagocitosis de las células tumorales. Con este fin, las células de linfoma Raji humano se incubaron con los candidatos anti-CD47 de ratón 14, 19, 20 o 22, o con los anticuerpos anti-CD47 de ratón B6H12

o 2A1 a 1 µg/ml durante 30 minutos a +4°C, luego se lavaron e incubaron nuevamente en medio libre de anticuerpos durante 24 horas a +37°C. Luego se recogieron las células después de los tiempos de incubación de 24 horas (T+24 h) lavadas en STF y fijadas con PFA al 4%. Como Control Positivo de la tinción, las células también se fijaron con PFA al 4% justo antes de incubarse durante 24 horas (tiempo T0). Después del último tiempo de incubación, las células fijadas se tiñeron con un anticuerpo IgG anti-ratón de cabra conjugado con PE y se analizaron por citometría de flujo. Para cada anticuerpo, se registró la intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenida después de 24 horas (T+24h) de incubación y se comparó con la IFM obtenida en las células Raji analizadas justo antes de los períodos de incubación a +37°C (T0). Los resultados se expresaron como el porcentaje de disminución de la IFM de las células registradas después de una incubación de T+24 h a +37°C en comparación con la IFM registrada en T0 antes de los pasos de incubación.

[0130] Como se muestra en la Figura 21A, ya se observó una disminución importante de la IFM del candidato 14 después de 24 horas de incubación de las células Raji a 37°C, mientras que se observó una disminución más débil para los candidatos 19, 20 y 22, así como para el anticuerpo 2A1, pero no para B6H12. Estos resultados muestran que los anticuerpos anti-CD47 con una cinética de disociación muy rápida, como el candidato 14 que posee un valor de Koff superior a 1 x 10^{-3} s^{-1}, se desprenderán más rápidamente y con mayor fuerza de las células tumorales Raji, y por lo tanto pueden ser menos eficientes para mejorar la fagocitosis de células tumorales que los anticuerpos anti-CD47 con una tasa de disociación más lenta, como los candidatos 19, 20 y 22 que poseen un valor de Koff inferior a 1 x 10^{-3} s^{-1}.

[0131] Para abordar este punto, las células Raji se marcaron primero con colorante CFSE y luego se tiñeron con los anticuerpos anti-CD47 a 0,1 o 1 µg/ml durante 30 minutos a +4°C. Las células Raji se lavaron e incubaron durante 24 horas a +37°C en medio libre de anticuerpos como se describió anteriormente. Después del período de incubación de 24 horas (T+24h), las células Raji se analizaron en un ensayo de fagocitosis con hMDM utilizando un ensayo de fagocitosis de citometría de flujo, esencialmente como lo describen Tseng et al. (Tseng D., Volkmer JP., Willingham SB, Contreras-Trujillo H., et al. "Anti-CD47 antibody-mediated phagotcytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response", PNAS 110(27):11103-08 (2013)). Las células tumorales Raji diana, previamente teñidas con colorante CFSE antes de ser teñidas por los anticuerpos anti-CD47, se incubaron con hMDM que previamente se habían marcado con colorante Far-Red. Después de 60 minutos de incubación a 37°C, se recogieron las células, se analizaron por citometría de flujo y se monitorizó la fluorescencia CFSE y Far-Red. La población de células que aparecieron doblemente teñidas por CFSE y Far-Red correspondió a las células tumorales diana que habían sido fagocitadas por los macrófagos. Como Control Positivo de la fagocitosis (tiempo T0), se realizó el mismo experimento con la misma preparación de hMDM marcado con Far-Red e incubado con células Raji marcadas con CFSE teñidas con los diferentes anticuerpos anti-CD47 a 0,1 o 1 µg/mL como anteriormente, pero las células Raji no se incubaron durante 24 horas a +37°C. Esto corresponde al tiempo T0 de referencia antes de la incubación en medio libre de anticuerpos. El porcentaje de células fagocitadas se calculó a partir del porcentaje de células doblemente teñidas por CFSE y Far-Red en cada condición. El porcentaje de fagocitosis específico para cada anticuerpo se calculó restando el porcentaje de fagocitosis obtenido con células Raji tratadas en las mismas condiciones con un anticuerpo irrelevante. Los resultados finalmente se expresaron como el porcentaje de disminución de la fagocitosis específica obtenida en T+24 h en comparación con la fagocitosis específica medida en T0 para cada anticuerpo probado, aplicando la fórmula: % de disminución de la fagocitosis = (1 - (% de fagocitosis específica en T+24 h con anticuerpo A /% de fagocitosis específica en T0 con anticuerpo A)) x 100.

[0132] Como se muestra en la Figura 21B, se observó una disminución muy fuerte de la fagocitosis para las células Raji teñidas con el candidato 14 anti-CD47, para lo cual se observó una disminución del 60% de la fagocitosis después de la tinción con 1 µg/ml de candidato 14 e incluso se observó una disminución de hasta el 100% en las células Raji teñidas con 0,1 µg/ml. En contraste, solo se observó una disminución débil de la fagocitosis para las células Raji teñidas con los candidatos 19, 20 y 22 como para los puntos de referencia 2A1 y B6H12.

[0133] En general, estos resultados muestran que los anticuerpos anti-CD47 con una alta tasa de disociación caracterizada por un valor de Koff superior a 1 x 10^{-3} s^{-1} (como el candidato 14) se desprenderán fuerte y rápidamente de los glóbulos rojos, pero también perderán rápidamente La mayor parte de su actividad funcional en las células tumorales, i.d. mejora de la fagocitosis de células tumorales. Por lo tanto, dichos anticuerpos pueden tener un menor efecto secundario/hundimiento pero también una eficacia antitumoral más débil. Por el contrario, los anticuerpos anti-CD47 con una tasa de disociación muy lenta caracterizada por un valor de Koff inferior a 1 x 10^{-4} s^{-1} (como 2A1 y B6H12), se desprenderán más lentamente de las células tumorales, pero permanecerán atrapados en los glóbulos rojos y por lo tanto pueden tener un importante efecto de hundimiento y posiblemente más efectos secundarios. Por lo tanto, los anticuerpos anti-CD47 con cinética de disociación intermedia caracterizada por un valor de Koff comprendido entre 1 x 10^{-4} y 1 x 10^{-3} s^{-1} (como el candidato 19, 20 o 22) poseerá un equilibrio óptimo de unión/liberación de CD47 para acomodarse con un efecto de hundimiento débil mientras se mantiene su eficacia antitumoral.

11. Ensayo de apoptosis con células Jurkat

[0134] Entre los 8 candidatos evaluados, se encontró que los candidatos 14 y 15 inducen una apoptosis significativa de las células Jurkat humanas (células de leucemia de células T), y el candidato 26 también indujo una apoptosis débil (datos no mostrados), mientras que el candidato 20 y 22 no indujeron apoptosis. Estos datos sugieren que esta familia

de anticuerpos reconoció un epítopo en hCD47 que proporcionaba actividad de señalización a las células que expresan CD47 después del compromiso de CD47. Este tipo de anticuerpos agonistas pueden inducir efectos fuera de diana *in vivo*.

12. Resumen de la caracterización *in vitro*.

[0135] En resumen, se han producido, purificado y evaluado *in vitro* 34 anticuerpos anti-CD47 para determinar su especificidad y funcionalidad. Ocho candidatos (números 7, 14, 15, 19, 20, 22, 26, 33) fueron preseleccionados en función de su potencia en ensayos de unión y funcionales (inhibición de interacción hCD47/hSIRPα, inducción de fagocitosis), y luego se caracterizaron completamente en ensayos que miden su afinidad y actividad de aglutinación de glóbulos rojos.

[0136] Los 8 candidatos reconocieron fuertemente hCD47 y cynoCD47, y se unieron a hCD47 con una afinidad en el intervalo de 0,9 a 15,7nM. Los 8 candidatos inhibieron fuertemente la interacción hCD47/hSIRPα y fueron capaces de inducir la fagocitosis de las células de linfoma Raji por los macrófagos humanos.

[0137] Tres anticuerpos (candidatos 14, 15, 26) pertenecientes a la misma familia de clones, también reaccionaron de forma cruzada con mCD47, y se descubrió que inducen una apoptosis significativa de las células tumorales Jurkat e inducen una fuerte aglutinación de glóbulos rojos. Estos candidatos pueden inducir toxicidad potencial cuando se inyectan *in vivo*.

[0138] El candidato 20 (único en su familia de clones) tenía el mejor perfil, con una fuerte actividad funcional y una aglutinación de glóbulos rojos muy débil pero detectable, lo que indica una toxicidad potencial débil, si es que la hay.

[0139] Los candidatos 19 y 33 (misma familia de clones), así como los candidatos 7 y 22 (únicos en sus respectivas familias de clones) también mostraron actividades funcionales fuertes con algunas pero aceptable aglutinación de glóbulos rojos dependiendo del formato de IgG probado.

[0140] Los candidatos 19, 20 y 22 con valores de Koff entre 1×10^{-4} y 1×10^{-3} s^{-1} también mostraron una liberación rápida una vez unida a los glóbulos rojos humanos, pero mantuvieron una actividad funcional eficiente medida por la fagocitosis de las células tumorales por los macrófagos humanos.

IV. Caracterización *in vivo* de candidatos seleccionados de ratón anti-CD47

[0141] Los candidatos seleccionados 19, 20 y 22, específicos para hCD47, se probaron *in vivo* en modelos de xenoinjerto de tumor de ratón. Los candidatos 14 y 15 también se probaron *in vivo* en los primeros estudios como anticuerpos anti-CD47 mCD47 con reacción cruzada.

1. Modelo de linfoma humano Raji

[0142] Los candidatos anti-CD47 14, 19, 20 y 22 se evaluaron *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de linfoma no Hodgkin humano con ratones NOG (n=8 por grupo) injertados con células Raji (1,5 millones de células inyectadas por vía subcutánea en el flanco derecho). Diez días después del trasplante de células, los tumores eran palpables y se inició la terapia con anticuerpos (10 mg/kg/dosis, inyección intraperitoneal, 3 veces por semana hasta 8 semanas) para los cuatro candidatos anti-CD47 en paralelo con un anticuerpo de control negativo y los anticuerpos de referencia anti-CD47 2A1, B6H12 y VpX037-01LCl. Todos los anticuerpos estaban en el formato de isotipo mIgGl. El crecimiento tumoral se controló cada 2 días y se registró la supervivencia del ratón. Los cuatro candidatos 14, 19, 20 y 22 retrasaron el crecimiento de las células Raji, al igual que los puntos de referencia B6H12 y 2A1, pero no el anticuerpo VxP037-01LCl que reacciona de forma cruzada con el CD47 de ratón (Figura 9A). Como se muestra en la Figura 9B, también se encontró que los candidatos 20 y 22 inducen una protección significativa de los ratones en comparación con el grupo de control, al igual que los puntos de referencia B6H12 y 2A1, pero no VxP037-01LCl.

[0143] Estos resultados indicaron que los cuatro candidatos evaluados (candidatos 14, 19, 20 y 22) pudieron controlar el crecimiento de las células tumorales humanas NHL Raji en ratones inmunocomprometidos, como se informó anteriormente para anticuerpos de referencia anti-CD47, como B6H12. Los candidatos 20 y 22 parecían más potentes que los candidatos 14 y 19 para prolongar la supervivencia de los ratones.

2. Modelo de xenoinjerto de ovario humano A2780

[0144] El candidato 20 anti-CD47 se evaluó adicionalmente *in vivo* en el modelo de xenoinjerto ovárico A2780 humano solo o en combinación con el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab (Erbitux®) o el anticuerpo anti-HER2 Trastuzumab (Herceptin®). Las células A2780 expresan fuertemente CD47 tal como se detecta por la unión del candidato 20, así como Her2 como se detecta por unión de Herceptin® (datos no mostrados). En contraste, las células A2780 expresaban sólo bajos niveles de EGFR *in vitro* tal como se mide por tinción con Erbitux® (datos no mostrados). Los ratones NOG (n=4 por grupo) se injertaron con células A2780 (A2780/Luc) transfectadas con luciferasa (10 millones de células inyectadas por vía intraperitoneal). Un día después del trasplante de la célula, la terapia de anticuerpos (10 mg dosis,

inyección/kg/intraperitoneal, 3 veces por semana hasta 5 semanas) se comenzó con el candidato 20 anti-CD47 solo o en combinación con Herceptin® o Erbitux®.

[0145] La intensidad de bioluminiscencia (BLI) se controló cada 5 días desde las posiciones ventral y dorsal. Los resultados presentados en la Figura 10 mostraron que el tratamiento con el candidato 20 anti-CD47 solo retrasó el crecimiento de las células tumorales A2780. Un retraso en el crecimiento del tumor también se observó con Herceptin® solo, pero no con Erbitux® solo. Además, la combinación de candidato 20 anti-CD47 en combinación con Herceptin® o Erbitux® también retrasó el crecimiento de células A2780.

[0146] Estos resultados sugieren que el candidato 20 era capaz de controlar el crecimiento de células tumorales de ovario A2780 *in vivo* en ratones inmunocomprometidos con NOG cuando se usaba como agente único, y puede mostrar actividad cooperativa en combinación con el anticuerpo anti-Her-2 (Herceptin®) o anticuerpo anti-EGFR (Erbitux®).

3. Modelo de xenoinjerto de pulmón humano A549

[0147] El candidato 20 anti-CD47 también se evaluó *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma pulmonar humano A549 (Steiner P., Joynes C, Bassi R., Wang S., Tonra JR, et al. "Tumor Growth Inhibition with Cetuximab and Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer Xenografts Expressing Wild-type and mutated Epidermal Growth Factor Receptor", Clin Cancer Res 13 (5): 1542-51 (2007); Kellar A., Egan C y Morris D. "Preclinical Murine Models for Lung Cancer: Clinical trial Applications", BioMed Res Int 2015, ID 621324 (2015)) solo o en combinación con el anticuerpo anti-EGFR Cetuximab (Erbitux®) o el anticuerpo anti-HER2 Trastuzumab (Herceptin®). *In vitro*, células A549 (ATCC-CCL-185) expresan fuertemente CD47 tal como se detecta por la unión del candidato 20, así como EGFR tal como se mide por tinción con Erbitux®, y, con una intensidad más débil, Her2 como se detecta con Herceptin® por citometría de flujo (datos no mostrados). Los ratones NOG (n=4 por grupo) se injertaron con células A549 (10 millones de células inyectadas por vía subcutánea). Diez días después del trasplante de células, una vez que el tumor era palpable (volumen >30 mm), se inició la terapia con anticuerpos (10 mg/kg/dosis, inyección intraperitoneal, 3 veces por semana hasta 10 semanas) para el candidato 20 anti-CD47 solo o en combinación con Herceptin® o Erbitux®.

[0148] Como se muestra en la Figura 11, el candidato 20 anti-CD47 solo, así como Erbitux y Herceptin®, fueron capaces de retrasar el crecimiento de células A549 tumorales tal como se cuantifica por medición del volumen del tumor (Figura 11A) y fueron capaces de significativamente proteger a los ratones en comparación con el grupo de vehículos (Figura 11B). La combinación de candidato 20 anti-CD47 con Herceptin® resultó en un retraso más importante del crecimiento de las células A549 tumor (Figura 11 A) y a una mayor protección de los ratones en el análisis de supervivencia (Figura 11B).

[0149] Estos resultados sugieren que el candidato 20 anti-CD47, cuando se utiliza como agente único o en combinación con Herceptin®, era capaz de retrasar el crecimiento del adenocarcinoma de pulmón A549 *in vivo* en ratones NOG.

V. Humanización del candidato 20 anti-CD47

1. Candidatos 20 humanizados anti-CD47

[0150] Ratón candidato 20 fue seleccionado como el primer líder para la humanización. Se generaron cinco variantes de VH y 5 VL mediante injerto de CDR en marcos de aceptadores humanos. Las secuencias se analizaron para la eliminación de posibles epítopos de células T con alta afinidad de MHC clase II utilizando algoritmos in silico, así como para la presencia de modificaciones postraduccionales como la glicosilación y desamidación de Fv. Las secuencias de aminoácidos de las 5 variantes VH (VH1 a VH5) alineadas con la secuencia de la secuencia VH de ratón del candidato 20 (VH0), se presentan en la Figura 7. Las secuencias de aminoácidos de las 5 variantes VL (VL1 a VL5) alineadas con la secuencia de la secuencia VL de ratón del candidato 20 (VL0), se presentan en la Figura 8.

[0151] Las 5 variantes de VH humanizadas se clonaron en un vector de expresión que contenía una cadena principal Fcγ4-S228P humana (SEQ ID NO: 162) y las 5 variantes de VL humanizadas se clonaron en un vector de expresión que contenía una cadena principal Kappa humana (SEQ ID NO: 176), para generar variantes humanizadas de hIgG4/kappa. La mutación S228P se introdujo en el fragmento Fc de todos los anticuerpos hIgG4 para evitar posibles intercambios de cadena que se han observado con hIgG4 (Angal S., King D.J., Bodmer M.W., Turner A., Lawson A.D., Roberts G., Pedley D., y Adair J.R. "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody", Mol Immunol 30(1):105-8 (1993)). Se produjeron veinticinco variantes de hIgG4/kappa y se purificaron a partir de células CHO cotransfectadas con uno de los 5 vectores VH y uno de los 5 VL. Los anticuerpos resultantes se denominaron h20-VHx-VLx, donde h20 designó al candidato humanizado 20, VHx designó el dominio variable de la cadena pesada con la variante VH humanizada (VH1 a VH5), y Lx designó el dominio variable de la cadena ligera con la variante VL humanizada. x (VL1 a VL5). Los 25 anticuerpos purificados fueron probados por su actividad de unión y especificidad en células de linfoma Raji humano y células CHO transfectadas o no con hCD47 o mCD47, por su actividad funcional en la inhibición de la unión de hSIRPα en células Raji y por su capacidad para inducir aglutinación de glóbulos rojos humanos en el ensayo de aglutinación de sangre completa. La cinética (Kon y

Koff) y las constantes de afinidad (K_D) también fueron medidas por SPR en Biacore. En todos los ensayos, las 25 variantes humanizadas se compararon con un candidato 20 quimérico hIgG4 generado mediante la clonación de las secuencias VH0 y VL0 de ratón en los vectores apropiados que contienen un esqueleto humano Fcy4-S228P y Kappa humano.

[0152] Todos los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se resumen en la Tabla 12 y la Tabla 13 a continuación.

Tabla 12: Características de las variantes humanizadas del candidato 20

Nº candidato	Anticuerpo (hIgG4)	Unión CD47 (CE50 µg/mL)	Inhibición CD47/SIRPα (CI50 µg/mL)	Fagocitosis Raji / HDMC	Aglutinación RBC (3 donantes)
20	Quim. 20	0,150	0,138	++	+/-
20,1	h20-VH1-VL1	0,193	0,161	++	++
20,2	h20-VH1-VL2	0,218	0,216	++	++
20,3	h20-VH1-VL3	0,184	0,228	++	++/+++
20,4	h20-VH1-VL4	0,248	0,261	++	-
20,5	h20-VH1-VL5	0,206	0,111	++	+/++
20,6	h20-VH2-VL1	0,177	0,098	++	+/++
20,7	h20-VH2-VL2	0,156	0,076	Nd	+
20,8	h20-VH2-VL3	0,184	0,079	Nd	+
20,9	h20-VH2-VL4	0,173	0,123	Nd	+
20,10	h20-VH2-VL5	0,191	0,051	Nd	-
20,11	h20-VH3-VL1	0,145	0,118	++	+/-
20,12	h20-VH3-VL2	0,153	0,160	Nd	+/-
20,13	h20-VH3-VL3	0,147	0,173	Nd	+/-
20,14	h20-VH3-VL4	0,143	0,135	Nd	+
20,15	h20-VH3-VL5	0,143	0,113	Nd	+
20,16	h20-VH4-VL1	0,113	0,100	++	+/-
20,17	h20-VH4-VL2	0,124	0,086	Nd	+/-
20,18	h20-VH4-VL3	0,164	0,142	Nd	+/-
20,19	h20-VH4-VL4	0,139	0,192	Nd	-
20,20	h20-VH4-VL5	0,136	0,095	Nd	+/-
20,21	h20-VH5-VL1	0,190	0,169	++	+
20,22	h20-VH5-VL2	0,189	0,174	Nd	+/++
20,23	h20-VH5-VL3	0,190	0,169	Nd	+/-
20,24	h20-VH5-VL4	0,177	0,133	Nd	+/++
20,25	h20-VH5-VL5	0,159	0,112	Nd	+/-

nd: no hecho
Para la aglutinación de glóbulos rojos: +/-, se observa una aglutinación débil a 50 µg/ml de anticuerpo solamente; +, aglutinación a 50 µg/mL. anticuerpo; ++, aglutinación para concentraciones ≥16,7 µg/ml; +++, aglutinación para concentraciones ≥5,6 µg/mL

Tabla 13: Cinética y constantes de afinidad de anticuerpos anti-CD47 humanizados del candidato 20 por Biacore (valores medios de experimentos independientes)

Nº candidato	Anticuerpo (hIgG4)	Kon medio (1/Ms) $x10^3$	Koff medio (1/s) $x10^{-4}$	KD medio (nM)
20	Quim 20	169,33	5,05	3,22
20,1	h20-H1-L1	118,40	6,34	5,85
20,2	h20-H1-L2	119,50	6,91	6,45
20,3	h20-H1-L3	136,50	11,05	7,82
20,4	h20-H1-L4	130,95	8,39	7,33
20,5	h20-H1-L5	126,30	7,72	7,58
20,6	h20-H2-L1	197,50	5,95	3,53
20,7	h20-H2-L2	193,00	6,27	3,67
20,8	h20-H2-L3	189,00	6,60	3,77
20,9	h20-H2-L4	189,00	6,28	3,65
20,10	h20-H2-L5	219,00	6,32	3,34

(Continuación)

Nº candidato	Anticuerpo (hIgG4)	Kon medio (1/Ms) $x10^3$	Koff medio (1/s) $x10^{-4}$	KD medio (nM)
20	Quim 20	169,33	5,05	3,22
20,11	h20-H3-L1	222,00	5,61	2,79
20,12	h20-H3-L2	246,00	5,60	2,49
20,13	h20-H3-L3	213,50	5,94	3,05
20,14	h20-H3-L4	216,50	5,81	3,02
20,15	h20-H3-L5	242,00	5,28	2,36
20,16	h20-H4-L1	175,00	6,19	3,86
20,17	h20-H4-L2	167,50	6,34	4,18
20,18	h20-H4-L3	180,00	7,33	4,37
20,19	h20-H4-L4	179,00	6,85	4,15
20,20	h20-H4-L5	192,00	6,24	3,5
20,21	h20-H5-L1	115,90	9,79	9,2
20,22	h20-H5-L2	142,00	11,65	8,55
20,23	h20-H5-L3	104,20	8,41	9,93
20,24	h20-H5-L4	103,25	10,21	10,99
20,25	h20-H5-L5	126,40	10,86	9,69

[0153] Todas las variantes humanizadas con las secuencias VH1 y VH5 tenían una afinidad menor (mayor KD) que las otras variantes y menor que la del candidato quimérico 20. Las otras variantes mostraron constantes Kon, Koff y KD similares a las del candidato quimérico 20. Ninguna de las variantes mostró una afinidad aumentada significativa a hCD47 en comparación con el candidato quimérico 20. Se observó que los valores de Koff de todas las variantes humanizadas estaban en el intervalo de $5,3 \times 10^{-4}$ a $11,7 \times 10^{-4}$ s^{-1}.

[0154] Las 25 variantes se unieron fuertemente a CD47 expresado en células Raji con una CE_{50} similar a la CE_{50} del candidato quimérico 20. También reconocieron específicamente hCD47 pero no mCD47 expresado en células CHO, como el candidato quimérico 20 (no mostrado).

[0155] Las 25 variantes inhibieron fuertemente la unión de hSIRPα a CD47 expresado en células Raji, con un CI_{50} en el mismo intervalo que el CI_{50} del candidato quimérico 20. Las variantes con la secuencia VH2 tenían un CI_{50} más bajo que las otras variantes, así como el quimérico candidato 20.

[0156] Todas las variantes de hIgG4 probadas fueron capaces de mejorar la fagocitosis de las células Raji por los macrófagos humanos de una manera similar al candidato 20 hIgG4 quimérico.

[0157] Algunas variantes de la familia VH1 (h20-VH1-VL1, h20-VH1-VL2, h20-VH1-VL3, H20-VH1-VL5), variante h20-VH2-VL1 y variantes h20-VH5-VL2 y h20-VH5-VL4 mostró una tendencia a inducir más aglutinación de glóbulos rojos que las otras variantes, así como que el candidato quimérico 20.

2. Optimización de los anticuerpos humanizados y selección principal.

[0158] El análisis de potenciales epítopos de células T dentro de las secuencias VH y VL de las variantes humanizadas ha revelado la presencia de un epítopo de células T CD4+ de alta afinidad (LIYFASTKESGV) dentro del dominio CDR2 de las 5 variantes VL (VL1 a VL5). Este potencial epítopo de células T, también presente dentro de la CDR2 de la secuencia VLO de ratón, no se había eliminado en las 5 primeras variantes de VL humanizadas para evitar cualquier pérdida de afinidad y/o actividad de los primeros candidatos humanizados. Sin embargo, una mutación puntual F a Y en la posición 56 (F56Y) de la secuencia VL (numeración de aminoácidos sin el péptido señal) fue suficiente para eliminar la inmunogenicidad de este potencial epítopo de células T (LIYFASTKESGV a LIYYASTKESGV). Por lo tanto, la mutación F56Y se introdujo en las secuencias VL1 a VL5 humanizadas. Estas nuevas secuencias se designaron como VL1-F56Y a VL5-F56Y y los anticuerpos humanizados correspondientes producidos mediante la combinación de una de las variantes VH1 a VH5 con una de las variantes VL1-F56Y a VL5-F56Y se designaron como h20-Hx-LxY. Cinco variantes humanizadas (candidatos 20,26 (h20-H2-L5Y), 20,27 (h20-H3-L2Y), 20,28 (h20-H3-L3Y), 20,29 (h20-H4-L4Y), 20,30 (h20-H4-L5Y)) fueron seleccionados y producidos en un formato IgG4 humano que contiene la mutación S228P (SEQ ID NO: 162) conocida por estabilizar la proteína hIgG4 (Angal S et al. Mol Immunol, 1993). Los anticuerpos purificados se caracterizaron adicionalmente *in vitro* por su actividad de unión a hCD47 en células Raji, por su potencia para inhibir la interacción hCD47/hSIRPα en células Raji y por su actividad de aglutinación de glóbulos rojos humanos usando sangre completa. Las 5 variantes de Hx-LxY humanizado también se compararon con el candidato quimérico 20 producido en un formato hIgG4-S228P, así como con los anticuerpos humanizados AB06,12 y Hu5F9 clonados en un hIgG4-S228P.

[0159] Como se muestra en las Figuras 12 y 13, las cinco variantes mutantes de F56Y se unieron a las células Raji (FIG. 12) e inhibieron la unión de hSIRPα a las células Raji (FIG. 13) con una eficiencia similar a sus contrapartes no mutadas y similar al candidato quimérico 20. Las cinco variantes humanizadas con mutación F56Y tenían una actividad de aglutinación de glóbulos rojos ligeramente más alta en el análisis de sangre completa que el candidato quimérico 20, pero aún más baja que la referencia Hu5F9 (Tabla 14).

[0160] Finalmente, se descubrió que las cinco variantes humanizadas con mutaciones F56Y del candidato 20 mostraban un fuerte reconocimiento de hCD47 en las células Raji y una fuerte inhibición de la unión de hSIRPα a hCD47 en las células Raji, similar a los anticuerpos AB06,12 y Hu5F9 (Figura 14). La Tabla 14 a continuación resume los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

Tabla 14: Características de las variantes humanizadas de h20-Hx-LxY del candidato 20 (representativo de 2 experimentos independientes)

Anticuerpo (hIgG4-S228P	Unión CD47 (CE50, ng/mL)	Inhibición de CD47/SIRPα (CI50, ng/mL)	Aglutinación RBC (4 donantes)
h20-H2-L5Y, candidato 20,26	97,5	112,6	++; +; ++; +
h20-H3-L2Y, candidato 20,27	85,4	101,1	+; +; ++; +/-
h20-H3-L3Y, candidato 20,28	116,7	169,9	+; +; ++; +
h20-H4-L4Y, candidato 20,29	146,6	180,7	+; +; ++; +/-
h20-H4-L5Y, candidato 20,30	105,1	149,5	++; +; ++; ++
Candidato quimérico 20	75,1	110,2	+; +/-; +; +/-
Hu5F9	80,0	122,8	+++; +; +++; +++
AB06,12	83,1	97,2	+; +/-; +/-; -
+/-, se observa aglutinación débil a 50 µg/ml de anticuerpo solamente; +, aglutinación a 50 µg/ml anticuerpo; ++, aglutinación para concentraciones ≥16,7 µg/ml; +++, aglutinación para concentraciones ≥5,6 µg/ml			

[0161] La SPR (Biacore) determinó la cinética (Kon y Koff) y las constantes de afinidad (K_D) de las 5 nuevas variantes humanizadas de h20-Hx-LxY. Los resultados en la Tabla 15 muestran que las 5 variantes humanizadas con la mutación VL CDR2-F56Y han conservado una afinidad de 2,0 a 2,8 nM, similar al candidato 20 y similar a las variantes humanizadas correspondientes sin la mutación VL CDR2-F56Y (Tabla 15).

Tabla 15: Cinética y constantes de afinidad de variantes humanizadas anti-CD47 del candidato 20 con mutación VL CDR2-F56Y, medida por Biacore (valores medios de 2 experimentos independientes)

Anticuerpo (formato hIgG4	Kon medio (1/Ms) x 10^3	Koff medio (1/s) x 10^{-4}	KD medio (nM)	Rmax medio (RU)
h20-H2-L5Y, candidato 20,26	306,5	6,99	2,32	124,8
h20-H3-L2Y, candidato 20,27	292,0	5,84	2,06	106,6
h20-H3-L3Y, candidato 20,28	264,0	5,73	2,32	119,9
h20-H4-L4Y, candidato 20,29	305,5	7,61	2,61	102,4
h20-H4-L5Y, candidato 20,30	254,5	6,93	2,82	111,6
Candidato quimérico 20	225,0	5,43	2,48	144,6
Hu5F9-G4P	101,4	0,75	0,73	85,5

[0162] Las 5 variantes humanizadas con la mutación VL CDR2-F56Y también conservaron una cinética de disociación rápida, con un valor de Koff en el intervalo de 5,73 x 10^{-4} a 7,61 x 10^{-4} s-1, como se observó para el ratón y el candidato 20 (Tablas 13 y 15).

3. Humanización del candidato 22 anti-CD47

[0163] El ratón candidato 22 también fue seleccionado para la humanización. Se generaron cuatro variantes VH y 4 VL mediante injerto de CDR en marcos de aceptadores humanos, esencialmente como se describe para el candidato 20 de ratón. Las secuencias se analizaron para la eliminación de epítopos de células T potenciales con alta afinidad de MHC clase II usando algoritmos in silico, así como para la presencia de modificaciones postraduccionales como la glicosilación y desamidación de Fv.

[0164] Las 2 variantes de VH humanizadas h22-VH3 y h22-VH4 se clonaron en un vector de expresión que contenía una cadena principal Fcy4-S228P humana (SEQ ID NO: 162) y las 4 variantes de h22-VL humanizadas se clonaron en un vector de expresión que contenía una columna vertebral humana Kappa (SEQ ID NO: 176), para generar variantes humanizadas de hIgG4/kappa. Ocho de las variantes de hIgG4/kappa se produjeron y purificaron a partir de células CHO cotransfectadas con uno de los vectores h22-VH3 o h22-VH4 y uno de los 4 vectores h22-VL. Los anticuerpos resultantes se llamaron h22-VHx-VLx, donde h22 designó al candidato humanizado 22, VHx designó el dominio variable de la cadena pesada con la variante VH humanizada (VH3 a VH4), y Lx designó el dominio variable de la cadena ligera con la variante VL humanizada x (VL1 a VL4). La cinética (Kon y Koff) y las constantes de afinidad (K_D) de los 8 anticuerpos purificados se midieron por SPR en Biacore. Los 8 anticuerpos purificados también se probaron para determinar su actividad de unión y especificidad en células de linfoma de Raji humano, su actividad funcional para inhibir la unión de hSIRPα en células de Raji y su capacidad para inducir la aglutinación de glóbulos rojos humanos en sangre completa. En todos los ensayos, las 8 variantes humanizadas se compararon con un candidato 22 quimérico hIgG4 generado mediante la clonación de las secuencias VH y VL de ratón del candidato 22 en los vectores apropiados que contienen un esqueleto humano Fcy4-S228P y Kappa humano. Para la aglutinación de glóbulos rojos, las 8 variantes humanizadas también se compararon con el anticuerpo Hu5F9.

[0165] Todos los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se resumen en la Tabla 16 y la Tabla 17 a continuación.

Tabla 16: Características de las variantes humanizadas del candidato 22

Nº candidato	Anticuerpo (hIgG4)	Unión de CD47 (CE50 µg/mL)	Inhibición de CD47/SIRPα (CI50 µg/mL)	Aglutinación RBC (2 donantes)
22	Quim. 22	0,122	0,140	++
22,9	h22-VH3-VL1	0,101	0,075	+++
22,10	h22-VH3-VL2	0,141	0,109	+++
22,11	h22-VH3-VL3	0,139	0,096	+++/++++
22,12	h22-VH3-VL4	0,108	0,116	++++
22,13	h22-VH4-VL1	0,070	0,119	+++
22,14	h22-VH4-VL2	0,099	0,093	+++
22,15	h22-VH4-VL3	0,124	0,098	+++
22,16	h22-VH4-VL4	0,184	0,116	++++
-	Hu5F9	nt	nt	++/+++

nt; no probado;
+/-, se observa aglutinación débil a 50 µg/ml de anticuerpo solamente; +, aglutinación a 50 µg/ml de anticuerpo; ++, aglutinación para concentraciones ≥16,7 µg/ml; +++, aglutinación para concentraciones ≥5,6 µg/mL; ++++, aglutinación para concentraciones ≥1,9 µg/mL

Tabla 17: Cinética y constantes de afinidad de anticuerpos anti-CD47 humanizados del candidato 22 por Biacore (valores medios de 2 experimentos independientes)

Nº candidato	Anticuerpo (hIgG4)	Kon medio (1/Ms) $x10^3$	Koff medio (1/s) $x10^{-4}$	KD medio (nM)
22	Quim 22	31,15	3,81	12,20
20,9	h22-VH3-VL1	24,65	3,18	12,95
20,10	h22-VH3-VL2	28,75	3,15	11,05
20,11	h22-VH3-VL3	28,35	3,06	10,91
20,12	h22-VH3-VL4	25,25	2,52	10,00
20,13	h22-VH4-VL1	25,60	3,37	13,20
20,14	h22-VH4-VL2	31,25	3,25	10,44
20,15	h22-VH4-VL3	29,10	3,51	12,10
20,16	h22-VH4-VL4	28,15	2,63	9,37

[0166] Las 8 variantes humanizadas con las secuencias h22-VH3 o h22-VH4 combinadas con las secuencias h22-VL1 a h22-VL4 mostraron constantes Kon, Koff y KD similares a las del candidato quimérico 22. Ninguna de las

variantes mostró una afinidad aumentada significativa con hCD47 en comparación con el candidato quimérico 22. Se observó que los valores de Koff de todas las variantes humanizadas del candidato 22 estaban en el intervalo de 2,5 x 10^{-4} a 3,8 x 10^{-4} s^{-1}.

[0167] Las 8 variantes se unieron fuertemente a CD47 expresado en células Raji con una CE_{50} similar a la CE_{50} del candidato quimérico 22.

[0168] Las 8 variantes inhibieron fuertemente la unión de hSIRPα a CD47 expresado en células Raji, con un CI_{50} en el mismo intervalo que el CI_{50} del candidato quimérico 22.

[0169] Las 8 variantes mostraron una tendencia a inducir un poco más de aglutinación de glóbulos rojos que el candidato quimérico 22. Entre ellas, 5 tenían una propensión de aglutinación de glóbulos rojos similar a la del índice de referencia Hu5F9.

VI. Mapeo de epítopos, dimerización y glicosilación

1. Mapeo de epítopos

[0170] El epítopo reconocido en el antígeno hCD47 por los candidatos de ratón anti-CD47 20 y 22 se determinó usando el método de alta resolución desarrollado por CovalX (Bich C, Scott M., Panagiotidis A., Wenzel RJ, Nazabal A., Zenobi R. "Characterization of antibody-antigen interactions: Comparison between surface plasmon resonance measurements and hih-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", Analytical Biochem 375:35-45, (2008)). Los anticuerpos anti-CD47 se complejaron con una preparación soluble del dominio extracelular CD47 humano marcado con una etiqueta 6His (SEQ ID NO: 160).

[0171] Los complejos de anticuerpo anti-CD47/hCD47 luego se incubaron con reticuladores deuterados y se sometieron a escisión multi-enzimática. Después del enriquecimiento de los péptidos reticulados, las muestras se analizaron por espectrometría de masas de alta resolución (nLC-Orbitrap MS) y los datos generados se analizaron usando el software XQuest y Stavrox. El análisis MALDI ToF MS se realizó utilizando el módulo de interacción HM4 de CovalX con un láser de nitrógeno estándar y centrándose en diferentes intervalos de masa de 0 a 1500 kDa.

[0172] Como se muestra en la Figura 15, el análisis químico de reticulación mostró que el epítopo en hCD47 reconocido por el candidato quimérico 20 era discontinuo y comprendía los residuos de aminoácidos K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 y T120 (SEQ ID 151) o los residuos de aminoácidos xxK_{59}xxxR_{63}xx$Y_{66}T_{67}$xx-------xx$H_{108}T_{109}$xxxxxxxT_{117}xxT_{120}xx de hCD47 (SEQ ID 151) donde "x" es para cualquier residuo de aminoácido (numeración de acuerdo con SEQ ID NO: 151).

[0173] Un análisis similar mostró que el epítopo en hCD47 reconocido por el candidato quimérico 22 (Figura 16) también era discontinuo y comprendía K59, K61, S107, H108, T117, T120 y R121 de hCD47 (SEQ ID NO: 151) o los residuos de aminoácidos xxK_{59}xK_{61}xxxxxx--------xxxxxxxx$S_{107}H_{108}$xxxxxxxxT_{117}xx$T_{120}R_{121}$xx de hCD47 (SEQ ID 151), donde "x" es para cualquier residuo de aminoácido (numeración de acuerdo con SEQ ID NO: 151).

[0174] Usando el mismo método, también se determinó el epítopo en hCD47 reconocido por AB06,12 y se encontró que era diferente del candidato 20 o 22 (datos no mostrados).

2. Dimerización de CD47

[0175] El análisis de MALDI ToF de alta masa y el análisis SEC-HPLC de la preparación soluble de hCD47 (dominio de IgV extracelular) mostraron la presencia de monómero, dímero y multímeros de hCD47, formados naturalmente *in vitro*. Para investigar más a fondo la capacidad de los candidatos 20 y 22 para reconocer el dímero de hCD47, se sometió una mezcla de anticuerpo anti-CD47/hCD47 soluble a reticulación utilizando el kit de análisis Kval MALDI MS de CovalX con un exceso de antígeno. Los datos sugieren que el Candidato 20 puede unirse tanto al dímero (60,8%) como al monómero de hCD47 (39,2%), mientras que no se puede excluir que se detecten complejos de un anticuerpo con 2 monómeros (Tabla 18). De manera similar, el candidato 22 puede haber formado un enlace cruzado con el dímero hCD47 (3,8%) y el monómero (5%)(Tabla 18). Experimentos adicionales confirmaron que los candidatos 20 y 22 se unen tanto al monómero CD47 humano como al dímero CD47 humano que han sido purificados por SEC-HPLC (ver Figuras 18 y 19). El análisis del hCD47 soluble por SE-HPLC mostró heterogeneidad en la preparación de proteínas, con la presencia de supuestos monómeros y dímeros de CD47 (Figura 17). Las fracciones de monómero y dímero se purificaron adicionalmente mediante SE-HPLC semi preparativa usando Superdex 200 Increase 10/300 GL de GE Healthcare. El análisis de SDS-PAGE en condiciones no reductoras demostró además la pureza de las 2 fracciones, con una banda grande a ~30 kDa observada para la fracción de monómero CD47 correspondiente a los tamaños esperados de hCD47 glicosilado, y una banda principal ligeramente superior a 50 kDa observada para Fracción del dímero CD47 (Figura 18). El monómero CD47 purificado y las fracciones de dímero se recubrieron luego en placas ELISA y se probó la capacidad de los anticuerpos anti-CD47 para reconocer las 2 fracciones. Como se muestra en la Figura 19, los candidatos 20 y 22 fueron capaces de unir tanto el monómero como el dímero hCD47 con una eficacia similar.

Tabla 18: Análisis de hCD47 soluble en mezcla con candidato 20, candidato 22 y después de la reticulación entre hCD47 soluble y candidato 20 y candidato 22

Especies	MW (kDa)	% área
Candidato 20	149,981	0
Candidato 20 y un hCD47	176,412	39,2
Candidato 20 y dos hCD47	202,491	60,8
Candidato 22	150,150	91,2
Candidato 22 y un hCD47	176,750	5,0
Candidato 22 y dos hCD47	201,135	3,8

3. Reconocimiento de hCD47 desglicosilada

[0176] Se conoce desde hace más de 40 años (ver Meezan E., Wu H. C, Black P.H., Robbins P.W. "Comparative studies on the carbohydrate-containing membrane components of normal and virus-transformed mouse fibroblasts. II Separation of glycoproteins and glycopeptides by Saphadex chromatography", Biochemistry 8(6):2518-24 (1969)), que los mecanismos de glicosilación pueden modificarse en las células tumorales, lo que lleva a la expresión de proteínas con patrones de glicosilación alterados (para revisiones más recientes, ver también Pinho S.S. y Reis C.A. "Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications", Nat Rev Cancer 15: 540-55 (2015)). CD47 es una proteína transmembrana altamente glicosilada con 6 sitios de N-glicosilación en las posiciones N23, N34, N50, N73, N1, N206 (Lindberg F.P., Gresham H.D., Schwarz E. y Brown E.J. "Molecular Cloning of integrin-associated protein: An immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in $\alpha_v\beta_3$-dependent ligand binding", J Cell Biol 123: 485-96 (1993)).

[0177] Al estar el patrón de glicosilación de CD47 sujeto a modificaciones en las células tumorales, un aspecto clave a ser evaluado fue si los anticuerpos terapéuticos dependen del nivel de glicosilación de CD47 para su unión a la diana. Para abordar este punto, el hCD47 soluble se trató con PNGasa para eliminar las N-glucosilaciones (Maley F., Trimble RB, Tarentino AL y Plummer TH "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases", Anal. Biochem 180: 195-204 (1989)), luego los candidatos 20 o 22 se entrecruzaron utilizando DSS y K_200 durante 180 minutos a temperatura ambiente para generar anticuerpos anti-CD47/complejos reticulados con hCD47 desglicosilado. Estos complejos se usaron para monitorear la naturaleza de estas interacciones no covalentes según el método descrito por CovalX (Bich C, Scott M., Panagiotidis A., Wenzel RJ, Nazabal A., Zenobi R. "Characterization of antibody-antigen interactions: Comparison between surface plasmon resonance measurements and hih-mass matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry", Analytical Biochem 375:35-45 (2008)). Al monitorear las moléculas complejas y no complejas por MALDI-ToF, identificamos con éxito los picos correspondientes a los anticuerpos solubles agregados en exceso (148,944kDa para el candidato 20 y 149,173kDa para 22), así como de los complejos de anticuerpos-CD47 (respectivamente 174,407 kDa y 163,440 kDa), pero no pudo identificar un pico correspondiente al CD47 desglicosilado no complejado (15,901 kDa; ver Tabla 19). Estos datos sugieren que todos los hCD47 desglicosilados disponibles se complejaron con el candidato 20 o con el candidato 22, lo que respalda la noción de que los anticuerpos 20 y 22 son capaces de reconocer tanto el hCD47 glicosilado como el N-glicosilado.

Tabla 19: Análisis de espectrometría de masas del hCD47 desglicosilado soluble reticulado con el candidato 20 o el candidato 22

Especies	MW (kDa)	% área
Candidato 20	148,944	84,8
Candidato 20 y hCD47 deglicosilado monomérico	174,407	15,2
hCD47 deglicosilado monomérico	15,901	0
Candidato 22	149,173	92,8
Candidato 22 y hCD47 monomérico	163,440	7,2
hCD47 deglicosilado monomérico	15,901	0

[0178] Para confirmar y cuantificar el reconocimiento de hCD47 desglicosilada por los candidatos 20 y 22 como se observa con el enfoque CovalX, los anticuerpos se analizaron mediante ELISA en hCD47 recubierto y preparaciones de hCD47 desglicosilada. La eliminación exitosa de N-glucanos de hCD47 se confirmó por análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (no mostrado). Los candidatos 20 y 22 anti-CD47 se probaron en un formato quimérico hu-IgG4 en paralelo a la variante humanizada h20-H2L5Y también en el isotipo hu-IgG4. Los anticuerpos se probaron junto con los anticuerpos humanizados AB06,12 y Hu5F9 generados en un formato hu-IgG4 para permitir la misma

eficacia de reconocimiento por ELISA. Como se muestra en la Figura 22A y las Tablas 20, 21 y 22, aunque Hu5F9 y AB06,12 mostraron una unión máxima ligeramente inferior, todos los anticuerpos se unieron fuertemente con perfiles similares y CE50, CE95, constante de unión en equilibrio y valores de unión específica máxima (Bmax) a CD47 glicosilado ($Bmax_1$). En contraste, la unión de Hu5F9 y de AB06,12 a CD47 N-desglicosilada se redujo fuertemente en comparación con la unión observada para los candidatos quiméricos 20, 22 y para la variante humanizada h20-H2L5Y (Figura 22B, Tablas 20, 21 y 22). De hecho, los candidatos quiméricos 20, 22 y el anticuerpo humanizado h20-H2L5Y se unieron en CD47 desglicosilado con un valor de CE50 menor que 3,0 veces el valor de CE50 en CD47 glicosilado y/o con un valor de CE95 menor que 10,0 Valor de CE95 medido en CD47 glicosilado. En contraste, los valores de CE50 y CE95 de AB06,12 y Hu5F9 fueron más de 3,0 y 10,0 veces superiores a los valores de CE50 y CE95 medidos en CD47 glicosilado, respectivamente (Tabla 20). Además, los valores constantes de unión en equilibrio de los candidatos quiméricos 20, 22 y del anticuerpo humanizado h20-H2L5Y fueron ≤ 60 µm tanto en CD47 glicosilado como en N47 desglicosilado, mientras que los valores constantes de unión en equilibrio de AB06,12 y Hu5F9 fueron en el intervalo de 90-130 µm en CD47 N-desglicosilada (Tabla 21). Finalmente, los candidatos quiméricos 20, 22 y el anticuerpo humanizado h20-H2L5Y se unieron tanto a CD47 glicosilado como a N-desglicosilado con un valor de unión específica máxima (Bmax) ≥ 1,9 OD en CD47 glicosilado ($Bmax_1$) y desglicosilado ($Bmax_2$), mientras que los valores de $Bmax_2$ de AB06,12 y Hu5F9 fueron <1,5 OD en CD47 N-desglicosilada (Tabla 22).

[0179] Estos resultados demuestran además que el reconocimiento de hCD47 por los candidatos 20, 22 y por el anticuerpo humanizado h20-H2L5Y no depende del nivel de N-glicosilación de CD47. Por el contrario, los anticuerpos Hu5F9 y AB06,12 pierden significativamente su capacidad de unión en CD47 N-desglicosilada. Como el nivel de glicosilación y la naturaleza de las proteínas de la superficie celular pueden modificarse en las células tumorales, es posible que la glicosilación del antígeno CD47 también pueda modificarse cuando las células tumorales expresan o sobreexpresan. Cabe destacar que el patrón de glicosilación de CD47 no parece ser necesario para su interacción con SIRPα (Subramanian S., Boder E.T. y Discher D.E. "Phylogenetic divergence of CD47 interactions with human signal regulatory protein α reveals locus of species specificity". J. Biolog. Chem. 282(3):1805-18 (2007)), lo que sugiere que la glucosilación aberrante no alterará la interacción CD47/SIRPα. Por lo tanto, las células cancerígenas que sobreexpresan CD47 se protegerán de la fagocitosis independientemente de su patrón de glucosilación. Por el contrario, el patrón de N-glicosilación de hCD47 puede afectar la unión del anticuerpo y disminuir significativamente la eficacia terapéutica. Como consecuencia, esperamos un efecto antitumoral más amplio mediante el uso de anticuerpos terapéuticos anti-CD47 como 20, 22 y preferiblemente h20-H2L5Y, cuya unión a hCD47 no depende de su nivel de glicosilación.

Tabla 20: Características de la unión a hCD47 glicosilado en comparación con hCD47 N-desglicosilada de los candidatos quiméricos anti-CD47 20 y 22, anticuerpo h20-H2L5Y humanizado y anticuerpos de referencia, medidos por ELISA. Los valores de CE50 y CE95 se calcularon utilizando el modelo de regresión no lineal/log (anticuerpo) versus respuesta (cuatro parámetros) del software GraphPad Prism.

Anticuerpo (hu-IgG4)	Unión a hCD47-His glicosilado por ELISA		Unión a hCD47-His N-desglicosilado por ELISA		Relación EC desglicosilado / EC glicosilado	
	CE50 (pM)	**CE95 (pM)**	**CE50 (pM)**	**CE95 (pM)**	**Relación CE50**	**Relación CE95**
Candidato quimérico 20	28,0	667,0	47,4	3335,0	1,7	5,0
h20-H2L5Y	44,0	1334,0	96,0	11339,0	2,2	8,5
Candidato quimérico 22	38,7	4669,0	42,0	6670,0	1,1	1,4
AB06,12	75,4	2054,4	427,5	214782,0	5,7	107,4
Hu5F9	54,7	1961,0	253,5	54027,0	4,6	27,6

Tabla 21: Constante de unión de equilibrio en hCD47 glicosilado en comparación con hCD47 N-desglicosilada de candidatos quiméricos anti-CD47 20 y 22, anticuerpo h20-H2L5Y humanizado y anticuerpos de referencia, medidos por ELISA. Los valores constantes de unión de equilibrio se calcularon utilizando el modelo de saturación de unión/unión de un sitio del software GraphPad Prism (media +/- DE de triplicados).

Anticuerpo (hu-IgG4)	Constante de unión de equilibrio en hCD47 glicosilada (pM)		Constante de unión de equilibrio en hCD47 desglicosilada (pM)	
	media	DE	media	DE
Candidato quimérico 20	27,3	3,3	38,8	4,6
h20-H2L5Y	43,6	7,2	55,7	10,5
Candidato quimérico 22	34,4	6,7	31,8	5,9
AB06,12	67,0	6,8	93,6	28,6
Hu5F9	49,0	4,9	129,0	43,2

Tabla 22: Unión específica máxima (Bmax) en hCD47 glicosilado ($Bmax_1$) en comparación con hCD47 N-deglicosilada ($Bmax_2$) de los candidatos quiméricos anti-CD47 20 y 22, anticuerpo humanizado h20-H2L5Y y anticuerpos de referencia, medido por ELISA. Los valores de Bmax se calcularon usando el modelo de saturación de unión/unión de un sitio del software GraphPad Prism (media +/- DE de triplicados).

Anticuerpo (hu-IgG4)	Constante de unión de equilibrio en hCD47 glicosilada (pM)		Constante de unión de equilibrio en hCD47 desglicosilada (pM)	
	media	DE	media	DE
Candidato quimérico 20	2,90	0,07	2,20	0,05
h20-H2L5Y	2,85	0,09	1,97	0,07
Candidato quimérico 22	2,85	0,11	2,57	0,09
AB06,12	2,48	0,05	0,97	0,06
Hu5F9	2,66	0,05	1,40	0,10

VII. Eficacia *in vivo* del anticuerpo anti-CD47 humanizado h20-H2L5Y

[0180] La variante humanizada h20-H2L5Y se evaluó en un formato hu-IgG4 (h20-H2L5Y-G4) como agente único y en combinación con anti-Her2 Trastuzumab (Herceptin®) en el modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma de pulmón A549 como se describió anteriormente. Los ratones NOG (n=8 por grupo) se injertaron con células A549 (10 millones de células inyectadas por vía subcutánea). La terapia con anticuerpos se inició catorce días después del trasplante de células, una vez que el volumen del tumor era de aproximadamente 100 mm. El anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y y Herceptin® se inyectaron solos o en combinación a la dosis de 10 mg/kg/dosis mediante inyección intraperitoneal, 3 veces a la semana durante hasta 10 semanas. Como se muestra en la Figura 23 la combinación del anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y-G4 con Herceptin® prolonga significativamente la supervivencia de ratones tratados en comparación con el grupo de control de animales inyectados con el vehículo ($p<0,005$) y al grupo de los animales tratados con Herceptin® sola ($p<0,05$). Por lo tanto, estos resultados muestran una mayor eficacia de la combinación del anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y humanizado con Herceptin® para controlar el crecimiento del adenocarcinoma de pulmón A549 *in vivo* en ratones NOG, y confirman los resultados obtenidos previamente con el anti-CD47 de ratón candidato 20.

[0181] El anticuerpo humanizado h20-H2L5Y también se evaluó en un modelo de xenoinjerto de ratón de cáncer gástrico positivo para Her-2, como agente único y en combinación con anti-Her2 Trastuzumab (Herceptin®) que está aprobado para el tratamiento de cánceres gástricos metastásicos de sobreexpresión de Her2. Para este estudio, la línea celular NCI-N87 humana (ATCC®-CRL-5822) se seleccionó para xenoinjerto como un tumor gástrico positivo Her-2 en respuesta al tratamiento de Herceptin® (Matsui Y., Inomata M., Tojigamori M., Sonoda K., Shiraishi N., Kitano S. "Suppression of tumor growth in human gastric cancer with HER2 overexpression by an anti-HER2 antibody in a murine model", Int. J. Oncol. 27 (3): 681-5 (2005)). *In vitro*, estas células expresan muy fuertemente Her-2 tal como se detecta por la unión de Herceptin® y expresó fuertemente CD47 tal como se mide por tinción con anticuerpo H20-H2L5Y y el análisis de citometría de flujo (datos no mostrados). Los estudios se llevaron a cabo en ratones NOG, y el anticuerpo humanizado h20-H2L5Y se probó en un formato hu-IgG4-S228P-L235E (h20-H2L5Y-G4PE). Para este propósito, el anticuerpo humanizado h20-H2L5Y se produjo además en un formato hu-IgG4 que porta las mutaciones S228P y L235E después de la clonación de la variante h20-VH2 en un vector de expresión que contiene un esqueleto humano Fcγ4-S228P-L235E (SEQ ID NO: 164). Se ha demostrado que la mutación L235E reduce en gran medida la afinidad de los receptores hu-IgG4 a Fcγ (FcγR) y, por lo tanto, anula las funciones efectoras de Fc como ADCC o ADCP (Alegre M.L., Collins A.M., Pulito V.L., Brosius R.A., Olson W.C., etc. al. "Effect of a single amino acid mutation on the activating and immunosuppressive properties of a “humanized” OKT3 monoclonal antibody", J. Immunol. 148 (11): 3461-68 (1992); Reddy MP, Kinney CAS., Chaikin MA, Fishman-Lobell J, Tsui P, et al. "Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4", J. Immunol. 164: 1925-33 (2000)). Por lo tanto, la mutación L235E reducirá el riesgo de efectos secundarios como la fagocitosis o la lisis de las células normales opsonizadas (como los glóbulos rojos, las plaquetas, etc.). Ratones NOG (n=8 por grupo) fueron injertados con células NCTN87 (10 millones de células inyectaron por vía subcutánea) y la terapia de

anticuerpos se inició siete días después del trasplante de células, una vez que el volumen del tumor fue de aproximadamente 100 mm^3. El anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y-G4PE se inyectó solo o en combinación en LOMG/kg/dosis, mientras que Herceptin® se inyectó solo o en combinación a la dosis de 2,5 mg/kg/dosis. Los anticuerpos se administraron mediante inyección intraperitoneal, 3 veces por semana durante hasta 5 semanas. Como se muestra en la Figura 24, se observó un retraso del crecimiento de NCTN87 en el grupo de ratones tratados con el anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y-G4PE solo, y se observó un retraso más fuerte del crecimiento de NCI-N87 en ratones tratados con combinación de Herceptin con el anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y-G4PE (Figura 24). Se obtuvieron resultados similares cuando el estudio se realizó en ratones NOD/SCID (datos no mostrados). Esta reducción del crecimiento del tumor NCTN87 en el grupo de ratones tratados con la combinación de Herceptin® y anti-CD47 H20-H2L5Y-G4PE fue estadísticamente superior en comparación con el grupo de ratones tratados con Herceptin® sola ($p<0,05$, prueba t de Student), demostrando así el efecto cooperativo entre anticuerpo anti-CD47 h20-H2L5Y y Herceptin® para el control de la proliferación de células tumorales NCTN87 *in vivo*, y, potencialmente, de otros tumores gástricos positivos Her-2.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0182]

<110> Blink Biomedical

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-CD47 HUMANIZADOS, DE RATÓN O QUIMÉRICOS

<130> PAT017/PCT

<160> 176

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Humano

<400> 1

Lys Tyr Trp Met His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10G7; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 2

Glu Ile Asn Pro Ser Asp Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10G7; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 3

Val Ala Thr Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10G7; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr Trp
1 5

<210> 5
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10G7; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 5

Ile Asn Pro Ser Asp Thr Tyr Thr
1 5

<210> 6
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10G7; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 6

Ala Arg Val Ala Thr Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Gly Ala Val Val
1 5 10

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 8

Leu Ala Thr Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 9

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 10

Gln Asp Val Ser Gly Ala
1 5

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 11

Leu Ala Thr Tyr
1

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 13

Asn Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 14

Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 15

Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 17

Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 18

Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VT008-AL6-16K1antibody; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-16K1; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 20

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-16K1; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 21

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-16K1; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 22

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-16K1; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 23

Lys Val Ser Asn
1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-16K1; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 24

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr
1 5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 25

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 26

Arg Ile Asp Pro Asn Thr Val Asp Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 27

Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 28

Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr Trp
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 29

Ile Asp Pro Asn Thr Val Asp Ala
1 5

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 30

Ser Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18K21; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 31

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18K21; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 32

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18K21; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 33

Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18K21; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 34

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18K21; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 35

Lys Val Ser Asn
1

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL6-18K21; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 36

Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7G1; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 37

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7G1; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 38

Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 39
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7G1; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 39

Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7G1; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 40

Val Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7G1; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 41

Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7G1; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 42

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 43

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 44

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 45

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 46

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 47

Phe Ala Ser Thr
1

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 48

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 49

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 50

Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 51

Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr
1 5

<210> 52
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 52

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 53

Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr
1 5

<210> 54
<211> 11

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 54

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 55

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 56

Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 57

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 58

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Ile Asp Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 59

Phe Ala Ser Thr
1

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 60

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 61

Thr Tyr Trp Met His
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 62

Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 63

Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 64

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp
1 5

<210> 65
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 65

Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr
1 5

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 66

Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr
1 5 10

<210> 67
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 67

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 68
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 68

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 69

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr

1 5

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 70

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 71
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 71

Trp Ala Ser Thr
1

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 72

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
1 5

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 73

Asn Tyr Trp Ile His
1 5

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 74

Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 75
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 75

Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 76
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 76

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 77

Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 78

Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 79
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 79

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 80
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 80

Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser
1 5

<210> 81
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 81

Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 82

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Val
1 5 10

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 83

Lys Val Ser Tyr
1

<210> 84
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 84

Phe Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 85
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 85

Asn Tyr Trp Ile Tyr
1 5

<210> 86
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 86

Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 5 10 15

Asp

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 87

Gly Gly Phe Thr Met Asp Phe
1 5

<210> 88
<211> 8
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 88

Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr Trp
1 5

<210> 89
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 89

Ile Asn Pro Arg Ser Asp Asp Thr
1 5

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 90

Ala Arg Gly Gly Phe Thr Met Asp Phe
1 5

<210> 91
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 91

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 92

Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser
1 5

<210> 93
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 93

Ser Gln Gly Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 94

Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 95
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 95

Lys Val Ser Tyr
1

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 96

Ser Gln Gly Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 97
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 97

Gly Tyr Asn Ile Tyr
1 5

<210> 98
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 98

Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 99

Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 100

Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
1 5

<210> 101
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 101

Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Ser
1 5

<210> 102
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 102

Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5

<210> 103
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 103

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Lys Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 104
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 104

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 105

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 105

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 106
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 106

Gln Ser Leu Val Lys Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 107
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 107

Lys Val Ser Asn
1

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 108

Ser Gln Thr Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 109
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; cadena pesada; CDR1-Kabat

<400> 109

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 110
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; cadena pesada; CDR2-Kabat

<400> 110

Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 111
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; cadena pesada; CDR3-Kabat

<400> 111

Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Thr Met Asp Tyr Val
1 5 10

<210> 112
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; cadena pesada; CDR1-IMGT

<400> 112

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 113
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; cadena pesada; CDR2-IMGT

<400> 113

Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr
1 5

<210> 114
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; cadena pesada; CDR3-IMGT

<400> 114

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Thr Met Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 115
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; cadena ligera; CDR1-Kabat

<400> 115

Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn His Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 116
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; cadena ligera; CDR2-Kabat

<400> 116

Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 117
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; cadena ligera; CDR3-Kabat

<400> 117

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 118
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; cadena ligera; CDR1-IMGT

<400> 118

Gln Asn Leu Leu Asn Ser Asn Asn Gln Lys Asn His
1 5 10

<210> 119
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; cadena ligera; CDR2-IMGT

<400> 119

Phe Ala Ser Thr
1

<210> 120
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; cadena ligera; CDR3-IMGT

<400> 120

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 121
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10G7; region variable cadena pesada

<400> 121

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Met Pro Gly Ser
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Lys Tyr
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Lys Arg Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

        35                  40                  45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asp Thr Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Lys Ser Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Val Ala Thr Met Val Ala Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
        115                 120
```

<210> 122
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL5-10K7; region variable cadena ligera

<400> 122

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Gly Ala
            20                  25                  30

Val Val Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Asn Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Leu Ala Thr Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Val Gln Ala
65                  70                  75                  80

Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ile Pro Trp
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

<210> 123
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-14G1; region variable cadena pesada

<400> 123

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Asn Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 124
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-16K1; region variable cadena ligera

<400> 124

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
```

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 125
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18G1; region variable cadena pesada

<400> 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Thr Val Asp Ala Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Ile Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 126
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-18K21; region variable cadena ligera

<400> 126

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Thr Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Phe Gln Ser
                85                  90                  95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 127
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; region variable cadena ligera

<400> 127

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Val Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

                85                  90                  95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 128
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-7K6; region variable cadena ligera

<400> 128

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Met Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 129
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; region variable cadena pesada

<400> 129

```
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Ala Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Glu Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 130
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable cadena ligera

<400> 130

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Gln Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln

                85                  90                  95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 131
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; region variable cadena pesada

<400> 131

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
        115
```

<210> 132
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; region variable cadena ligera

<400> 132

```
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1               5                  10                  15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
                85                  90                  95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 133
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10G3; region variable cadena pesada

<400> 133

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
            20                  25                  30

Trp Ile His Trp Leu Asn Gln Arg Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Thr Tyr
65                  70                  75                  80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

                100                 105                 110

        Thr Val Ser Ser
                115
```

<210> 134
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-10K1; region variable cadena ligera

<400> 134

```
Asp Val Val Met Pro Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Asp His Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Ile Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Ser
                85                  90                  95

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 135
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20G7; region variable cadena pesada

<400> 135

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Asn Tyr
            20                  25                  30
```

Trp Ile Tyr Trp Val Lys Glu Arg Pro Gly Gln Val Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Asp Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Leu Thr Asn Asp Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Thr Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 136
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-20K7; region variable cadena ligera

<400> 136

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Gly
85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 137
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39G2; region variable cadena pesada

<400> 137

```
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30

Asn Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ser His Gly Asn Ile Leu Asp Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asn Gly Ile Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly Gly Tyr Thr Met Asp Tyr Gly Gly Gln Gly Thr Ser Val
            100                 105                 110

Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 138
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL6-39K2; region variable cadena ligera

<400> 138

```
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Lys Ser
            20                  25                  30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
        35                  40                  45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                  55                  60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65                  70                  75                  80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Phe Cys Ser Gln Thr
                85                  90                  95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 139
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8G5; region variable cadena pesada

<400> 139

```
Leu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Gln Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Pro Tyr Tyr Gly Ser Arg Trp Asp Tyr Thr Met Asp Tyr Trp
            100                 105                 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 140
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL17-8K7; region variable cadena ligera

<400> 140

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Met Ser Val Gly
1               5                  10                  15

Gln Lys Ala Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Asn Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Asn Asn Gln Lys Asn His Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 141
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; region variable humanizada cadena pesada; VH1

<400> 141

```
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Val Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Ala Lys Leu Thr Ala Ala Thr Ser Ala Ser Ile Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Phe Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 142
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; region variable humanizada cadena pesada; VH2

<400> 142

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 143
<211> 118
<212> **PRT**
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; region variable humanizada cadena pesada; VH3

<400> 143

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala His
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Ala Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 144
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; region variable humanizada cadena pesada; VH4

<400> 144

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 145
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14G4; region variable humanizada cadena pesada; VH5

<400> 145

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 146
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL1

<400> 146

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 147
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL2

<400> 147

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
```

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 148
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL3

<400> 148

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 149
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL4

<400> 149

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Val Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 150
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL5

<400> 150

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                   10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30
```

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Arg

<210> 151
<211> 323
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr
100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Asn Glu Asn Ile Leu
130 135 140

Ile Val Ile Phe Pro Ile Phe Ala Ile Leu Leu Phe Trp Gly Gln Phe
145 150 155 160

Gly Ile Lys Thr Leu Lys Tyr Arg Ser Gly Gly Met Asp Glu Lys Thr
165 170 175

Ile Ala Leu Leu Val Ala Gly Leu Val Ile Thr Val Ile Val Ile Val
180 185 190

Gly Ala Ile Leu Phe Val Pro Gly Glu Tyr Ser Leu Lys Asn Ala Thr
195 200 205

Gly Leu Gly Leu Ile Val Thr Ser Thr Gly Ile Leu Ile Leu Leu His
210 215 220

Tyr Tyr Val Phe Ser Thr Ala Ile Gly Leu Thr Ser Phe Val Ile Ala
225 230 235 240

Ile Leu Val Ile Gln Val Ile Ala Tyr Ile Leu Ala Val Val Gly Leu
245 250 255

Ser Leu Cys Ile Ala Ala Cys Ile Pro Met His Gly Pro Leu Leu Ile
260 265 270

Ser Gly Leu Ser Ile Leu Ala Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Val Tyr
275 280 285

Met Lys Phe Val Ala Ser Asn Gln Lys Thr Ile Gln Pro Pro Arg Lys
290 295 300

Ala Val Glu Glu Pro Leu Asn Ala Phe Lys Glu Ser Lys Gly Met Met
305 310 315 320

Asn Asp Glu

<210> 152
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR2-Kabat; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 152

Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser
1 5

<210> 153
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VT008-AL18-14K1; cadena ligera; CDR2-IMGT; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 153

Tyr Ala Ser Thr
1

<210> 154
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable cadena ligera; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 154

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Met Ser Val Gly
1 5 10 15

Gln Lys Val Thr Met Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ile Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 155
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL1; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 155

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
                85                  90                  95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110

Lys
```

<210> 156
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL2; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 156

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30
```

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 157
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL3; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 157

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 158
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL4; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 158

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 159
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL18-14K1; region variable humanizada cadena ligera; VL5; epítopo corregido CD4+ célula T

<400> 159

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser

20 25 30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Arg

<210> 160
<211> 153
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hu-sCD47-6His; dominio extracelular de antígeno CD47 humano con etiqueta 6His

<400> 160

Met Trp Pro Leu Val Ala Ala Leu Leu Leu Gly Ser Ala Cys Cys Gly
1 5 10 15

Ser Ala Gln Leu Leu Phe Asn Lys Thr Lys Ser Val Glu Phe Thr Phe
20 25 30

Cys Asn Asp Thr Val Val Ile Pro Cys Phe Val Thr Asn Met Glu Ala
35 40 45

Gln Asn Thr Thr Glu Val Tyr Val Lys Trp Lys Phe Lys Gly Arg Asp
50 55 60

Ile Tyr Thr Phe Asp Gly Ala Leu Asn Lys Ser Thr Val Pro Thr Asp
65 70 75 80

Phe Ser Ser Ala Lys Ile Glu Val Ser Gln Leu Leu Lys Gly Asp Ala
85 90 95

Ser Leu Lys Met Asp Lys Ser Asp Ala Val Ser His Thr Gly Asn Tyr

100 105 110

Thr Cys Glu Val Thr Glu Leu Thr Arg Glu Gly Glu Thr Ile Ile Glu
115 120 125

Leu Lys Tyr Arg Val Val Ser Trp Phe Ser Pro Ala Ser Ser Ser Gly
130 135 140

Ser Ser Ser His His His His His His
145 150

<210> 161
<211> 981
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hu-IgG4 S228P; secuencia de nucleótidos de mutante IgG4 S228P humano

<400> 161

gctagcacca agggcccctc tgtgtttcct ctggcccctt gctcccggtc cacctccgaa 60

tctacagccg ctctgggctg cctcgtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc 120

tggaactctg gcgccctgac cagcggagtg cataccttcc ctgctgtgct gcagtcctcc 180

ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccaagacc 240

tatacctgca acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagag agtggaatct 300

aagtacggcc ctccctgccc cccttgtcct gcccctgaat ttctgggcgg accctccgtg 360

ttcctgttcc ccccaaagcc taaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc 420

tgcgtggtgg tggatgtgtc tcaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac 480

ggcgtggaag tgcataatgc caagaccaag cctcgggaag aacagttcaa ctccacctac 540

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag 600

tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaaa agaccatctc caaggccaag 660

ggccagcccc gggaacccca ggtgtacaca ctgcctccat cccaggaaga gatgaccaag 720

aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggattctacc cctccgatat cgccgtggaa 780

tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggactcc 840

gacggctcct tcttcctgta ctctcgcctg accgtggaca agtcccggtg gcaggaaggc 900

aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 960

ctgtctctgt ccctgggcaa g 981

<210> 162
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> huIgG4_S228P; secuencia de aminoácidos de mutante humano IgG4 S228P

<400> 162

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
```

```
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
```

<210> 163
<211> 981
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> hu-IgG4 S228P-L235E; secuencia de nucleótidos de mutante doble humano IgG4 S228P

<400> 163

```
gctagcacca agggcccctc tgtgtttcct ctggcccctt gctcccggtc cacctccgaa       60

tctacagccg ctctgggctg cctcgtgaaa gactacttcc ccgagcctgt gacagtgtcc      120

tggaactctg gcgccctgac cagcggagtg cataccttcc ctgctgtgct gcagtcctcc      180

ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtgaca gtgccctcca gctctctggg caccaagacc      240

tatacctgca acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagag agtggaatct      300

aagtacggcc ctccctgccc cccttgtcct gcccctgaat ttgaaggcgg accctccgtg      360

ttcctgttcc ccccaaagcc taaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc      420

tgcgtggtgg tggatgtgtc tcaggaagat cccgaggtgc agttcaattg gtacgtggac      480

ggcgtggaag tgcataatgc caagaccaag cctcgggaag aacagttcaa ctccacctac      540

cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag      600

tgcaaggtgt ccaacaaggg cctgcccagc tccatcgaaa agaccatctc caaggccaag      660

ggccagcccc gggaacccca ggtgtacaca ctgcctccat cccaggaaga gatgaccaag      720

aaccaggtgt ccctgacctg tctcgtgaag ggattctacc cctccgatat cgccgtggaa      780

tgggagtcca acggccagcc tgagaacaac tacaagacca ccccccctgt gctggactcc      840

gacggctcct tcttcctgta ctctcgcctg accgtggaca agtcccggtg gcaggaaggc      900

aacgtgttct cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc      960

ctgtctctgt ccctgggcaa g                                                981
```

<210> 164
<211> 327
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> huIgG4_S228P_L235E; secuencia de aminoácidos mutante doble humano IgG4 S228P_L235E

<400> 164

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1               5                  10                  15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
            20                  25                  30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
        35                  40                  45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
    50                  55                  60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                  70                  75                  80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85                  90                  95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
            100                 105                 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
        115                 120                 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
    130                 135                 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                 150                 155                 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
                165                 170                 175
```

```
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
            180                 185                 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
        195                 200                 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
    210                 215                 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                 230                 235                 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
                245                 250                 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
            260                 265                 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
        275                 280                 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                 310                 315                 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325
```

<210> 165
<211> 444
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h20-H2-L5Y; cadena pesada en formato huIgG4_S228P

<400> 165

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45
```

```
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300
```

```
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    370                 375                 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                405                 410                 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            420                 425                 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
        435                 440
```

<210> 166
<211> 444
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h20-H2; cadena pesada en formato hu-IgG4_S228P_L325E

<400> 166

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
            20                  25                  30

Tyr Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Ile Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Lys Lys Phe
    50                  55                  60
```

```
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Ala Arg Gly His Tyr Gly Arg Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
    210                 215                 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320
```

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 167
<211> 220
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> h20-L5Y; cadena ligera

<400> 167

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Ile Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Lys Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145 150 155 160

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
165 170 175

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
180 185 190

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 168
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; region variable humanizada cadena pesada; VH1m

<400> 168

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val His Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 169
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; region variable humanizada cadena pesada; VH2m

<400> 169

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 170
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; region variable humanizada cadena pesada; VH3

<400> 170

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                  10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 171
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8G5; region variable humanizada cadena pesada; VH4

<400> 171

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1               5                   10                  15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
            20                  25                  30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45

Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
    50                  55                  60

Lys Ser Arg Val Thr Leu Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95

Thr Arg Ser His Tyr Tyr Asp Gly His Phe Ser Tyr Trp Gly Gln Gly
            100                 105                 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 172
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; region variable humanizada cadena ligera; VL1

<400> 172

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Phe Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
                85                  90                  95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Val Lys
            100                 105                 110
```

<210> 173
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; region variable humanizada cadena ligera; VL2

<400> 173

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
                85                  90                  95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 174
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; region variable humanizada cadena ligera; VL3

<400> 174

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1               5                  10                  15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln
        35                  40                  45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80
```

Ile Asp Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 175
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo VL008-AL13-8K3; region variable humanizada cadena ligera; VL4

<400> 175

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ala Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 176
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Region constante de kappa humano cadena ligera

<400> 176

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

```
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
            20                  25                  30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
        35                  40                  45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
    50                  55                  60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65                  70                  75                  80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
                85                  90                  95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
            100                 105
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-CD47 que comprende:

a. una cadena pesada que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NOs: 49-51 (anotación Kabat) o SEQ ID NOs: 52-54 (anotación IMGT) y una cadena ligera que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NO: 55, 152 y 57 (anotación Kabat) o SEQ ID NO: 58, 153 y 60 (anotación IMGT); o

b. una cadena pesada que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NOs: 49-51 (anotación Kabat) o SEQ ID NOs: 52-54 (anotación IMGT) y una cadena ligera que tiene cada una de las secuencias CDR establecidas en SEQ ID NO: 55-57 (anotación Kabat) o SEQ ID NO: 58-60 (anotación IMGT).

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende:

a. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 142 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 159;
b. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 156;
c. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 157;
d. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 158;
e. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 159.
f. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 141 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 146;
g. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 141 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 147;
h. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 141 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 148;
i. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 141 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 149;
j. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 141 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 150;
k. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 142 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 146;
l. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 142 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 147;
m. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 142 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 148;
n. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 142 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 149;
o. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 142 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 150;
p. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 146;
q. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 147;
r. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 148;
s. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 149;
t. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 143 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 150;
u. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 146;
v. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 147;
w. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 148;
x. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 149;
y. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 144 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 150;

z. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 145 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 146;
aa. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 145 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 147;
bb. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 145 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 148;
cc. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 145 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 149; o
dd. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 145 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 150.

3. Un anticuerpo anti-CD47 que comprende una cadena pesada que tiene cada una de las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 61-63 (anotación Kabat) o SEQ ID NO: 64-66 (anotación IMGT) y una cadena ligera que tiene cada una de las secuencias de CDR establecidas en SEQ ID NO: 67-69 (anotación Kabat) o SEQ ID NO: 70-72 (anotación IMGT).

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende:

a. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 168 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 172;
b. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 168 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 173;
c. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 168 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 174;
d. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 168 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 175;
e. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 169 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 172;
f. Secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 169 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 173;
g. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 169 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 174;
h. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 169 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 175;
i. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 170 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 172;
j. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 170 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 173;
k. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 170 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 174;
l. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 170 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 175;
m. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 171 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 172;
n. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 171 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 173;
o. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 171 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 174; o
p. una secuencia VH que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 171 y una secuencia VL que comprende la secuencia establecida en SEQ ID NO: 175.

5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo se une a CD47 glicosilado y no glicosilado, opcionalmente en donde el anticuerpo se une a glicosilado y formas desglicosiladas de CD47 humano, y en donde la unión del anticuerpo a CD47 no depende de la glucosilación de CD47, opcionalmente en donde:

a. la forma glicosilada de CD47 humano comprende uno o más residuos N-glicosilados en las posiciones N23, N34, N50, N73, N111 y/o N206 en la secuencia de aminoácidos de CD47 humano (SEQ ID NO: 151); y/o
b. la forma desglicosilada de CD47 humano comprende CD47 humano glicosilado que ha sido tratado con un péptido N-glucosidasa (PNGasa) para la eliminación de N-glucosilaciones; y/o

c. el anticuerpo se une específicamente a CD47 glicosilado y no glicosilado e interrumpe la interacción CD47-SIRPα, preferiblemente el anticuerpo se une específicamente a CD47 humano glicosilado y no glicosilado e interrumpe la interacción CD47-SIRPα humano, respectivamente.

6. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en donde:

(a) el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, y en donde el fragmento de anticuerpo es opcionalmente un $F(ab')_2$, un scFv o un fragmento Fab, o
(b) el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico.

7. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, que tiene un lgG4 humano con opcionalmente la mutación S228P (SEQ ID NO: 162) o opcionalmente la doble mutación S228P-L235E (SEQ ID NO: 164).

8. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en donde:

a. el anticuerpo se une a un epítopo discontinuo en CD47, preferiblemente CD47 humano; opcionalmente en donde el epítopo discontinuo comprende los residuos de aminoácidos K59, R63, Y66, T67, H108, T109, T117 y T120 de CD47 humano (SEQ ID 151); o el epítopo discontinuo comprende los residuos de aminoácidos K59, K61, S107, H108, T117, T120 y R121 de CD47 humano (SEQ ID NO: 151); y/o
b. el anticuerpo se une al monómero CD47 y al dímero CD47, preferiblemente al monómero y al dímero CD47 humanos, respectivamente.

9. El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en donde:

a. una proporción de CE50 de unión del anticuerpo a formas no glicosilados versus formas glicosiladas de CD47 es inferior a 4:1,3: 1,2:1, 1:2, 1:3 o 1:4, preferiblemente en un intervalo de 4:1 a 1:4, más preferiblemente 3:1 a 1:3, lo más preferiblemente 2:1 a 1:2; y/o
b. una proporción de CE95 de unión del anticuerpo a formas no glicosilados versus formas glicosiladas de CD47 es inferior a 25:1, 20:1 o 10:1, 1:10, 1:20 o 1:25, preferiblemente en un intervalo de 10:1 a 1:10, más preferiblemente 9:1 a 1:9, lo más preferiblemente 10:1 a 1:10; y/o
c. el anticuerpo se une a cada CD47 glicosilado y no glicosilado con una constante de unión en equilibrio de 80 pM o inferior, preferiblemente 70 pM o inferior, más preferiblemente 60 pM o inferior; y/o
d. una capacidad de unión máxima (Bmax2) del anticuerpo contra CD47 no glicosilado es al menos el 60% de una capacidad de unión máxima ($Bmax_1$) del anticuerpo contra CD47 glicosilado; y/o
e. el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a CD47 glicosilado y/o no glicosilado de aproximadamente $1,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ (1/s) o más, tal como en donde el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a glicosilado y/o CD47 no glicosilado de $1,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-3}\ s^{-1}$, tal como en donde el anticuerpo tiene un valor Koff para unirse a CD47 glicosilado y/o no glicosilado de $2,5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ a $8,0 \times 10^{-4}\ s^{-1}$; y/o
f. el anticuerpo tiene un valor de Koff para unirse a CD47 de $1,0x10^{-4}\ s^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-1}\ s^{-1}$.

10. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo expuesto en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que opcionalmente comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo expuesto en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

12. Una célula que produce un anticuerpo establecido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

13. Un proceso para producir un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende cultivar la célula de la reivindicación 12 para que se exprese el polinucleótido de la reivindicación 11, y opcionalmente recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

14. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10, para usar en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto; opcionalmente en donde:

(a) la enfermedad es cáncer, opcionalmente en donde el cáncer es cáncer gástrico, de pulmón, de ovario o de mama, preferiblemente cáncer gástrico, y/o
(b) el anticuerpo se usa como monoterapia, y/o
(c) el anticuerpo se usa en terapia de combinación, preferiblemente una combinación con un inhibidor de Her-2 o un anticuerpo anti-Her2 o un inhibidor de EGFR o un anticuerpo anti-EGFR.

15. El anticuerpo o composición para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el sujeto es un humano o un animal no humano.

Figura 1

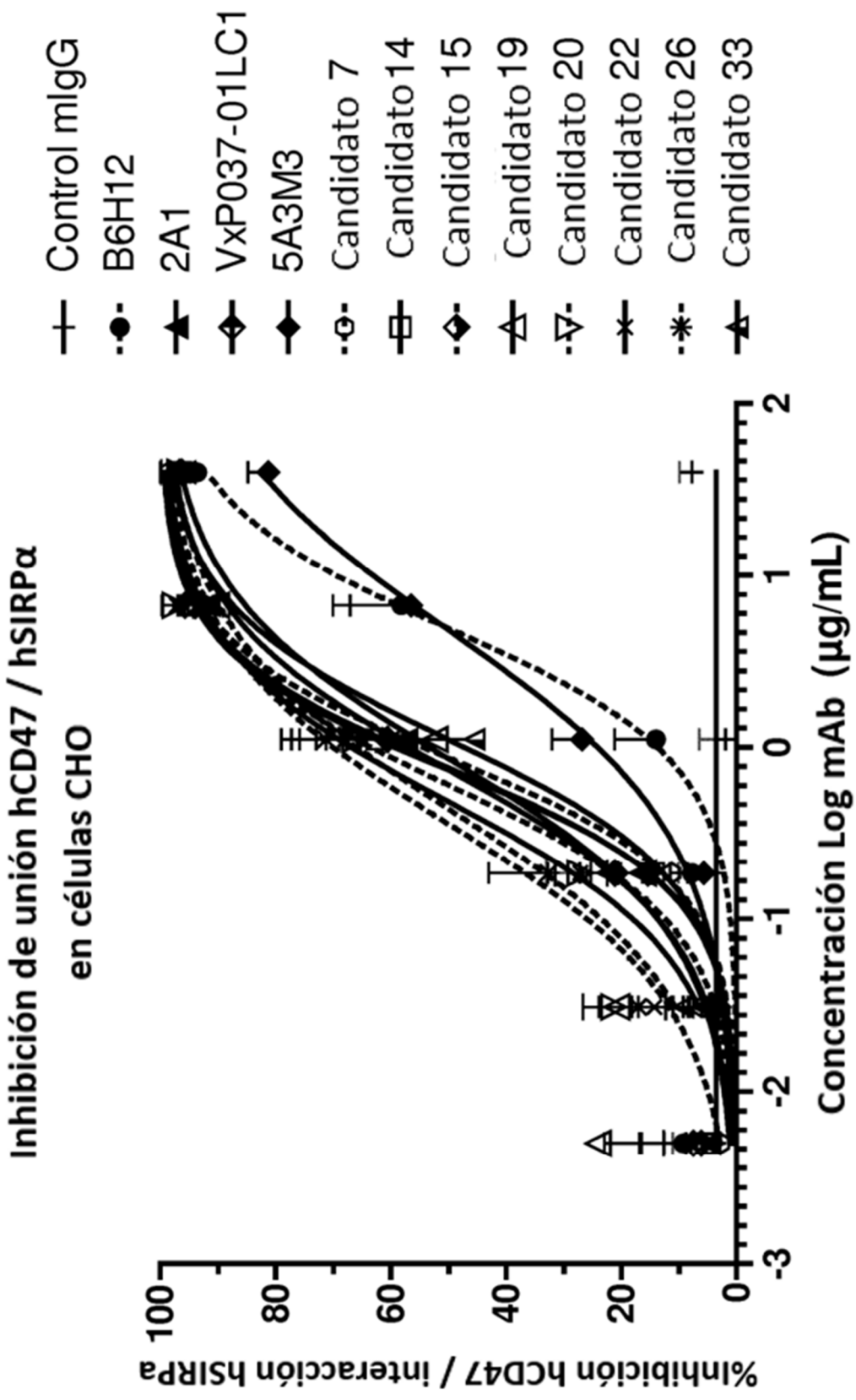

Inhibición de unión hCD47 / hSIRPα
en células CHO
Control mIgG
B6H12
2A1
VxP037-01LC1
5A3M3
Candidato 7
Candidato14
Candidato 15
Candidato19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 26
Candidato 33
%Inhibición hCD47 / interacción hSIRPa
100
80
60
40
20
0
-3
-2
-1
0
1
2
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 2

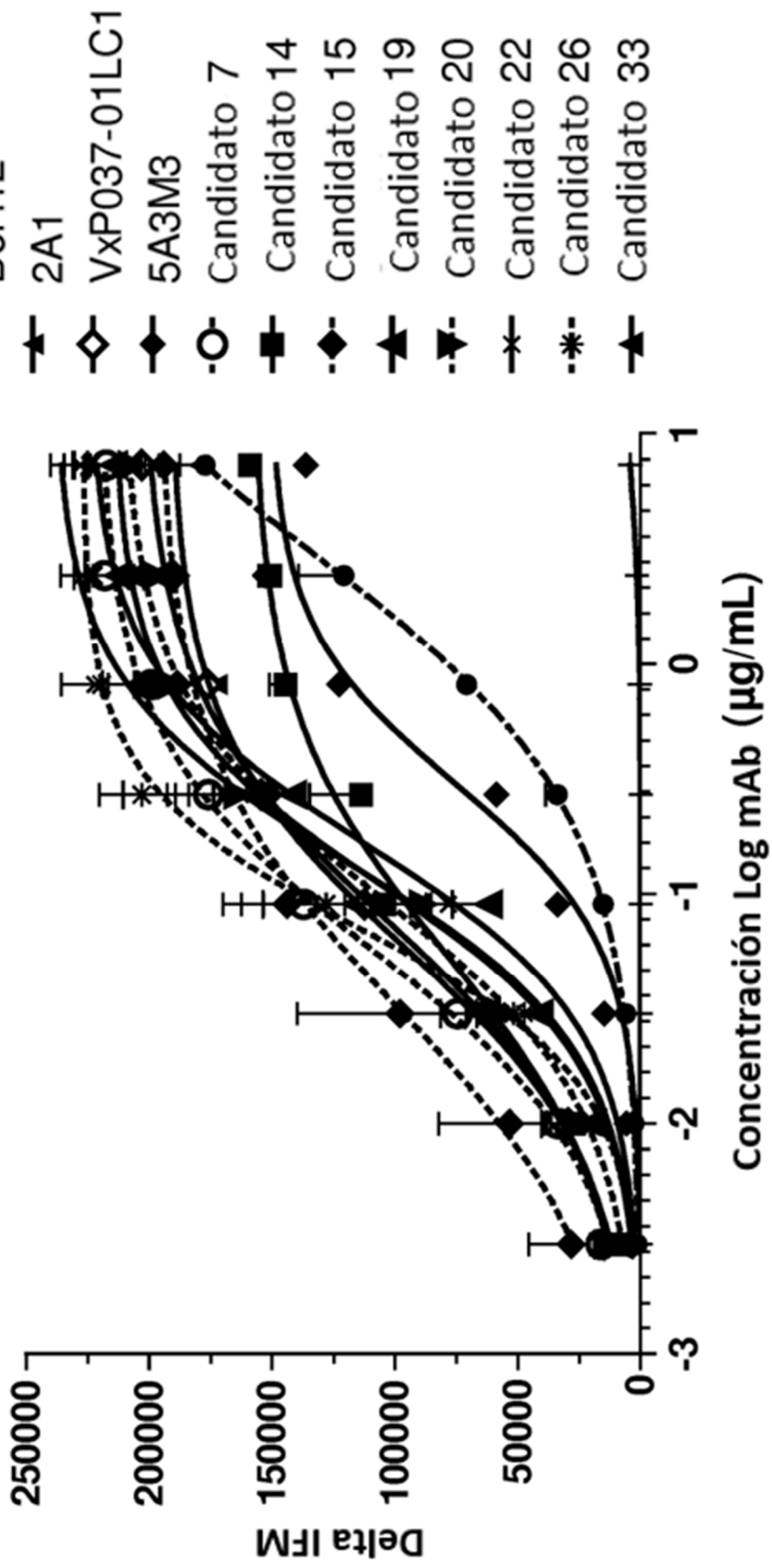

Unión en células Raji
Control mIgG
B6H12
2A1
VxP037-01LC1
5A3M3
Candidato 7
Candidato 14
Candidato 15
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 26
Candidato 33
Delta IFM
250000
200000
150000
100000
50000
0
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 3

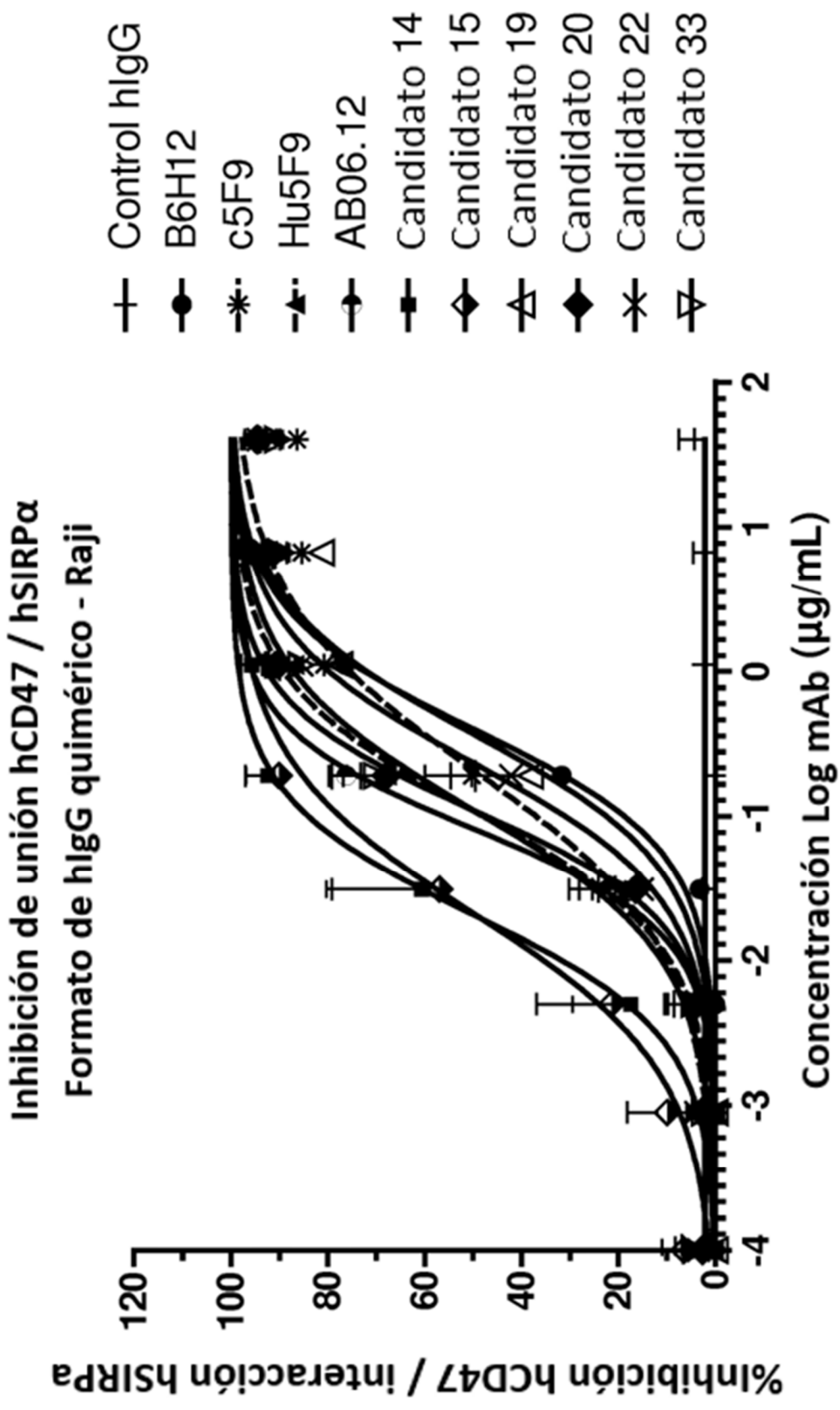

Inhibición de unión hCD47 / hSIRPα
Formato de hIgG quimérico - Raji
%Inhibición hCD47 / interacción hSIRPa
Concentración Log mAb (µg/mL)
Control hIgG
B6H12
c5F9
Hu5F9
AB06.12
Candidato 14
Candidato 15
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 33

Figura 4

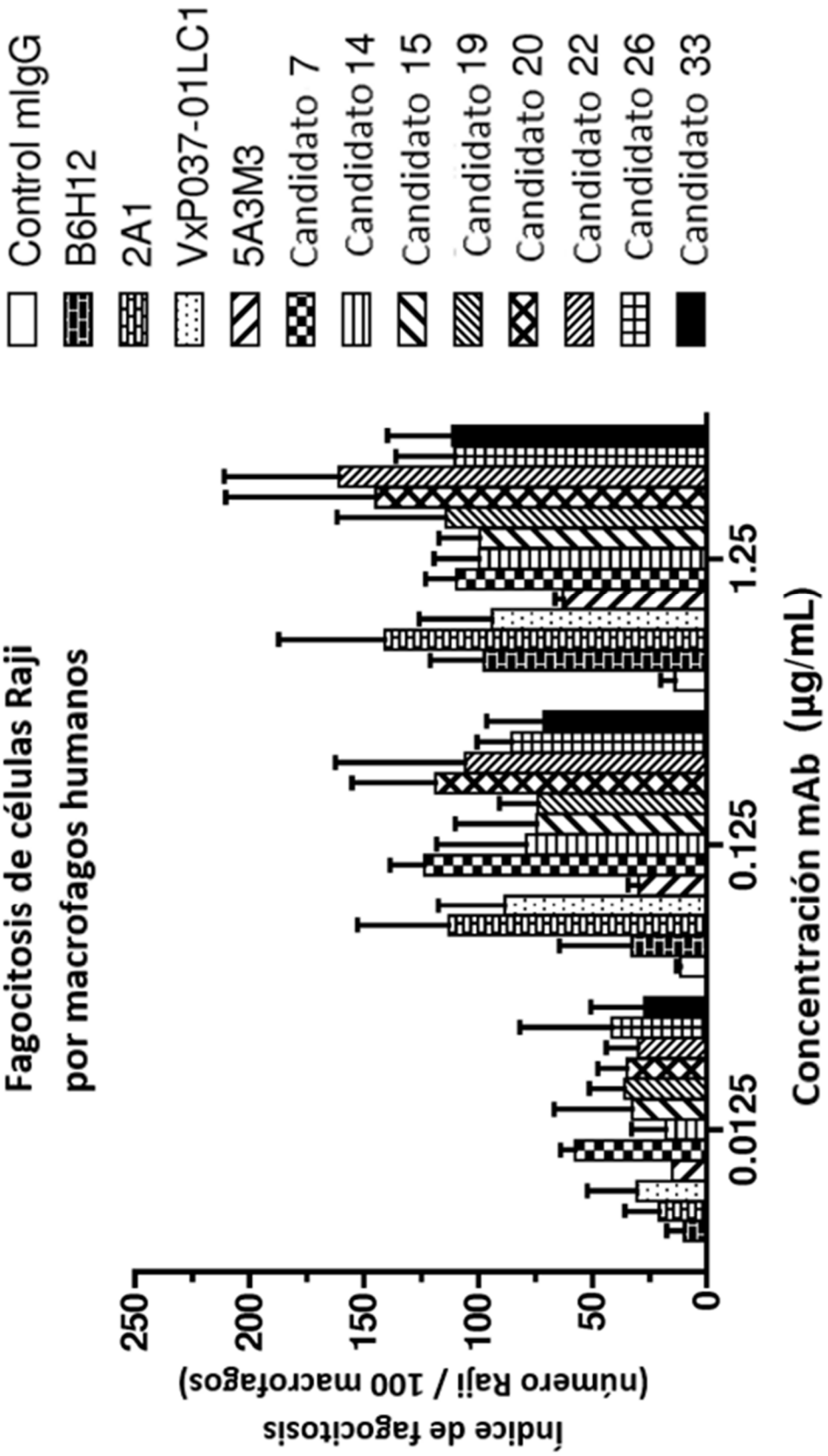

Fagocitosis de células Raji
por macrofagos humanos
Control mIgG
B6H12
2A1
VxP037-01LC1
5A3M3
Candidato 7
Candidato 14
Candidato 15
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 26
Candidato 33
índice de fagocitosis
(número Raji / 100 macrofagos)
250
200
150
100
50
0
0.0125
0.125
1.25
Concentración mAb (µg/mL)

Figura 5

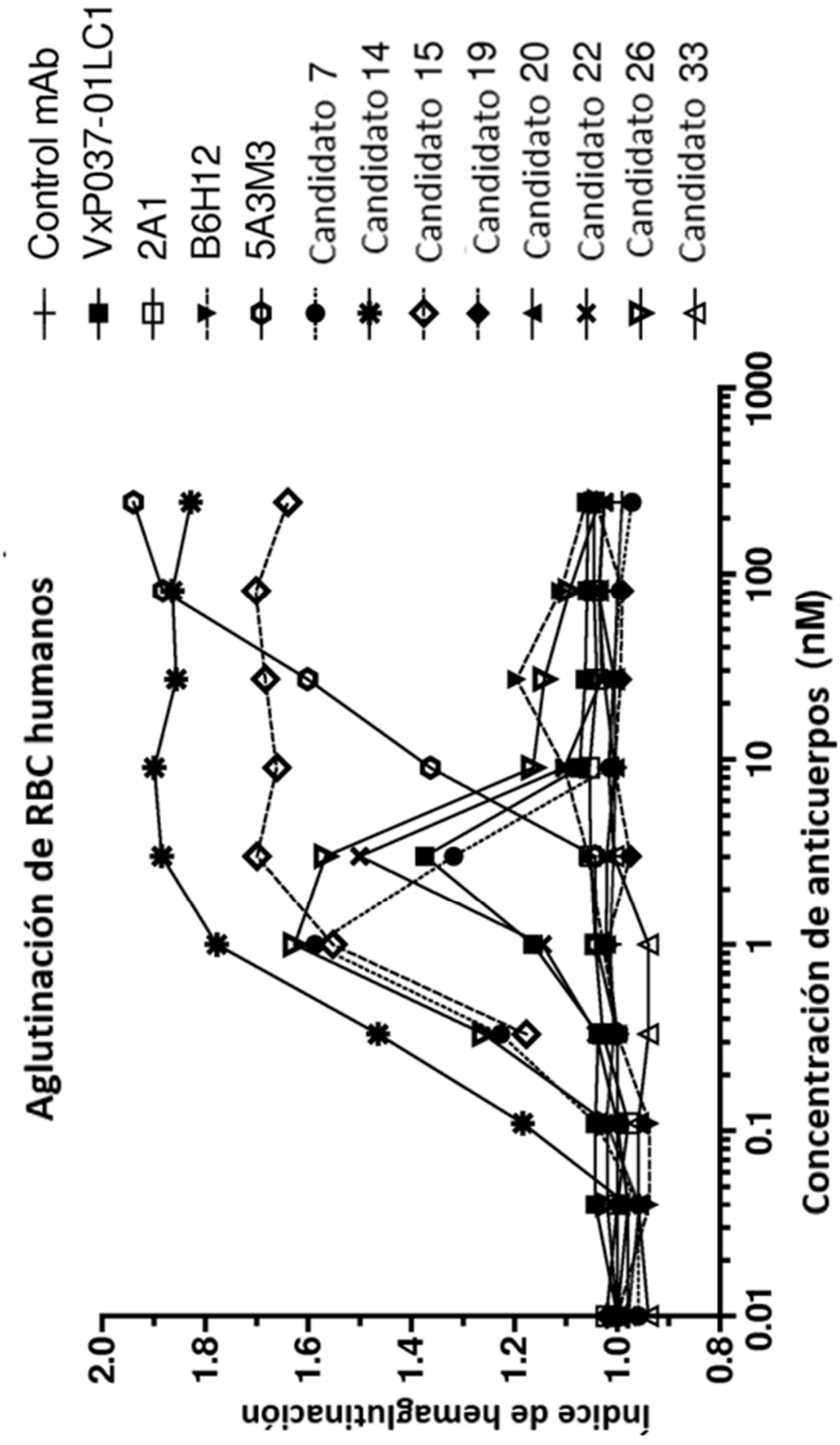

Aglutinación de RBC humanos
Índice de hemaglutinación
Concentración de anticuerpos (nM)
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.01
0.1
1
10
100
1000
Control mAb
VxP037-01LC1
2A1
B6H12
5A3M3
Candidato 7
Candidato 14
Candidato 15
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 26
Candidato 33

Figura 6

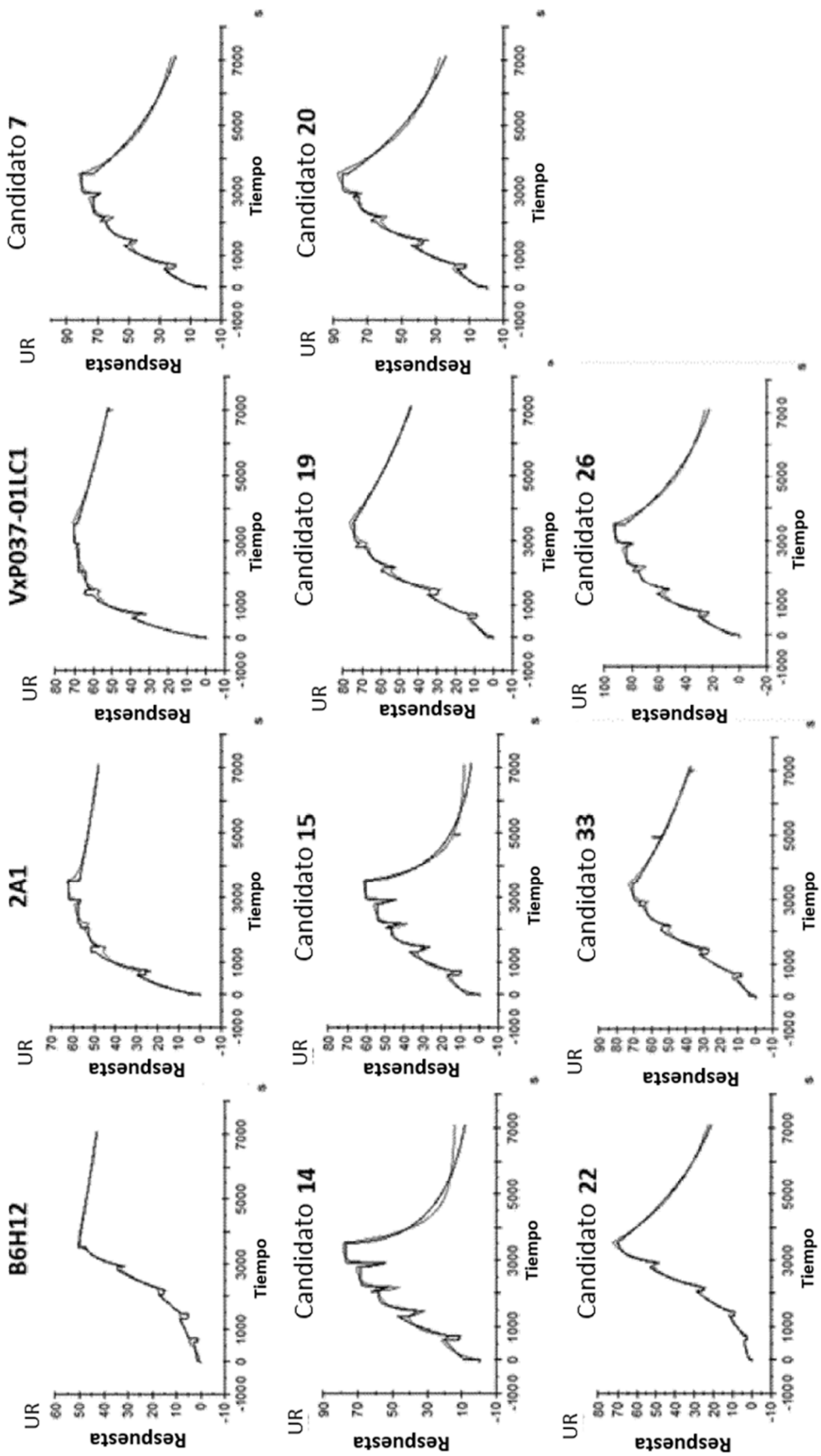

B6H12
2A1
VxP037-01LC1
Candidato 7
Candidato 14
Candidato 15
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 33
Candidato 26
UR
Respuesta
Tiempo
s

Figura 7

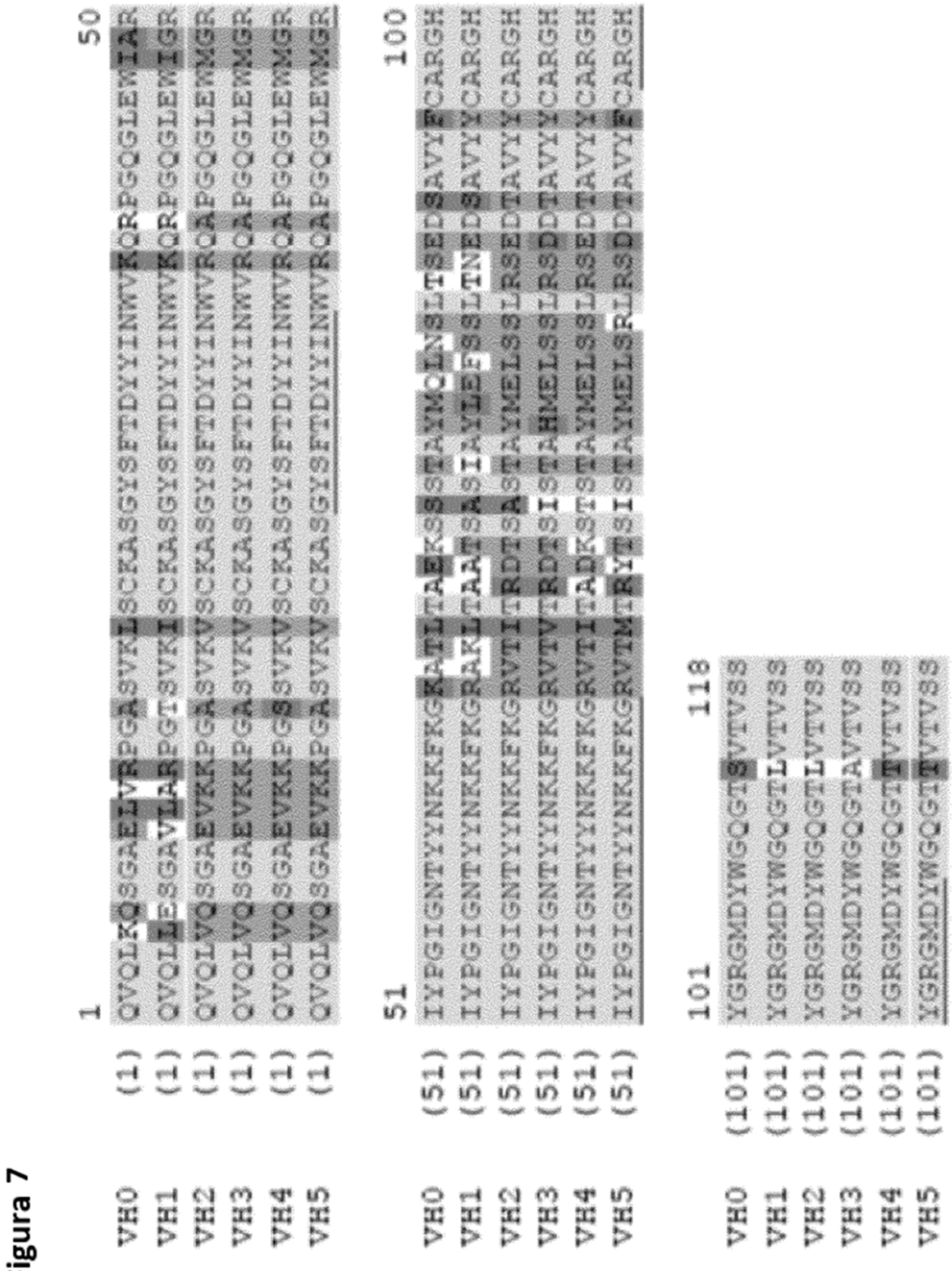

1 50
VH0 (1) QVQLKQSGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTDYYINWVKQRPGQGLEWIAR
VH1 (1) QVQLLESGAVLARPGTSVKISCKASGYSFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGR
VH2 (1) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGR
VH3 (1) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGR
VH4 (1) QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGR
VH5 (1) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTDYYINWVRQAPGQGLEWMGR
51 100
VH0 (51) IYPGIGNTYYNKKFKGKATLTAEKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCARGH
VH1 (51) IYPGIGNTYYNKKFKGRARLTAATSASIAYLEFSSLTNEDSAVYYCARGH
VH2 (51) IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGH
VH3 (51) IYPGIGNTYYNKKFKGRVTVTRDTSISTAHMELSSLRSDDTAVYYCARGH
VH4 (51) IYPGIGNTYYNKKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGH
VH5 (51) IYPGIGNTYYNKKFKGRVTMTRYTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCARGH
101 118
VH0 (101) YGRGMDYWGQGTSVTVSS
VH1 (101) YGRGMDYWGQGTLVTVSS
VH2 (101) YGRGMDYWGQGTLVTVSS
VH3 (101) YGRGMDYWGQGTAVTVSS
VH4 (101) YGRGMDYWGQGTTVTVSS
VH5 (101) YGRGMDYWGQGTTVTVSS

Figura 8

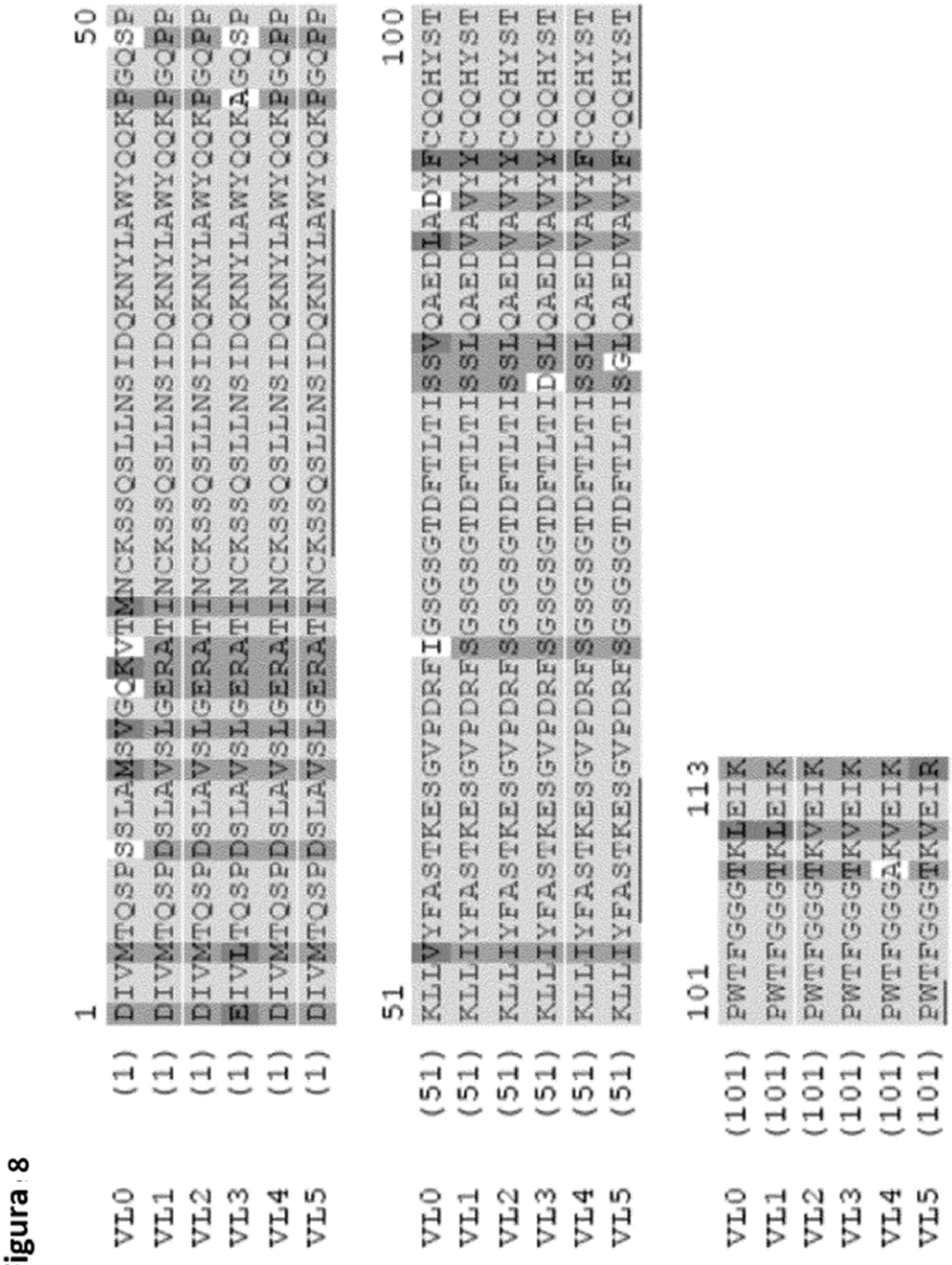

1 50
VL0 (1) DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQSP
VL1 (1) DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPP
VL2 (1) DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPP
VL3 (1) EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKAGQSP
VL4 (1) DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPP
VL5 (1) DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSIDQKNYLAWYQQKPGQPP
51 100
VL0 (51) KLLVYFASTKESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYST
VL1 (51) KLLIYFASTKESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYST
VL2 (51) KLLIYFASTKESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYST
VL3 (51) KLLIYFASTKESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQAEDVAVYYCQQHYST
VL4 (51) KLLIYFASTKESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYST
VL5 (51) KLLIYFASTKESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISGLQAEDVAVYFCQQHYST
101 113
VL0 (101) PWTFGGGTKLEIK
VL1 (101) PWTFGGGTKLEIK
VL2 (101) PWTFGGGTKVEIK
VL3 (101) PWTFGGGTKVEIK
VL4 (101) PWTFGGGAKVEIK
VL5 (101) PWTFGGGTKVEIR

Figura 9A

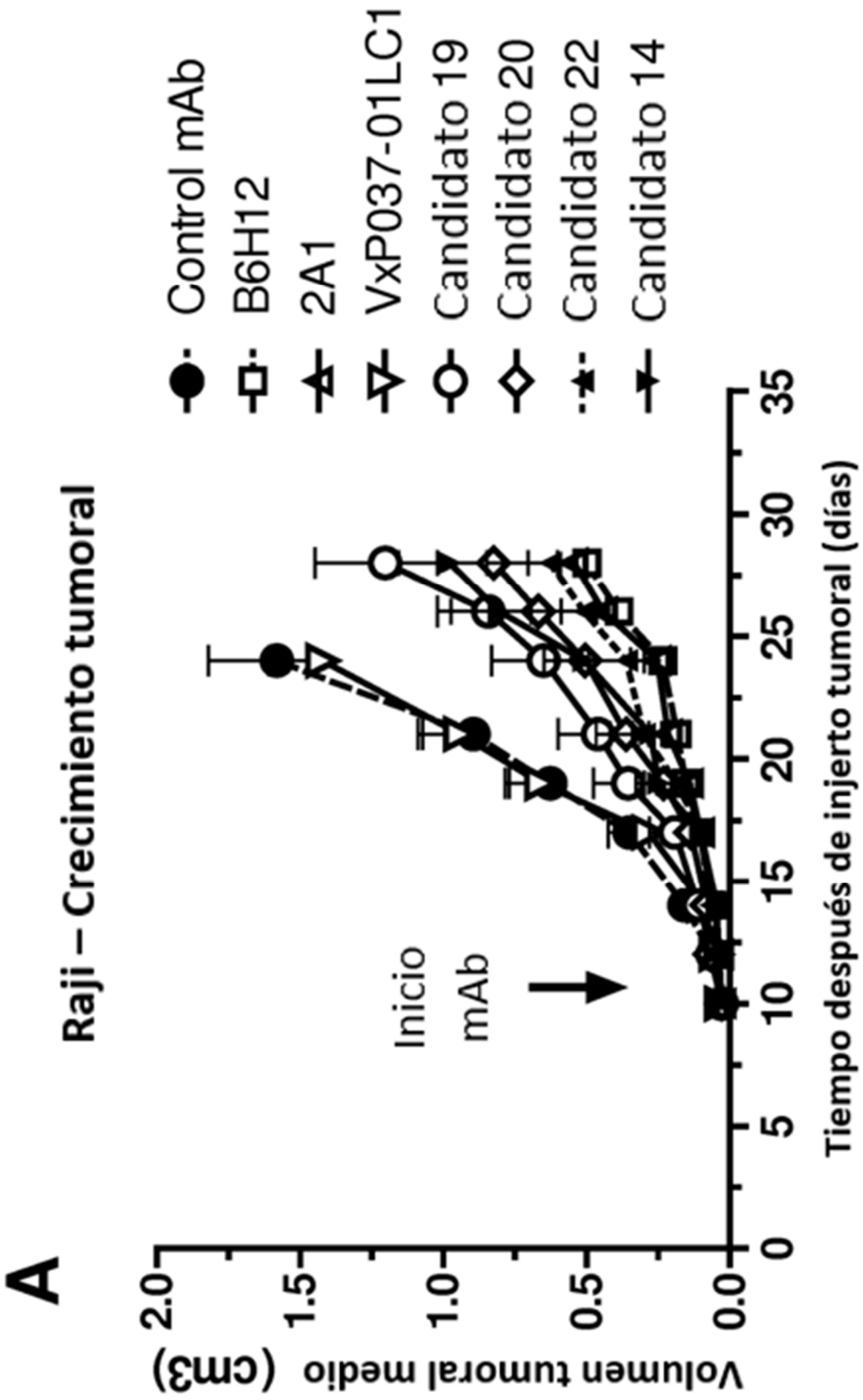

A
Raji – Crecimiento tumoral
Control mAb
B6H12
2A1
VxP037-01LC1
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
Candidato 14
Inicio mAb
Volumen tumoral medio (cm3)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo después de injerto tumoral (días)

Figura 9B

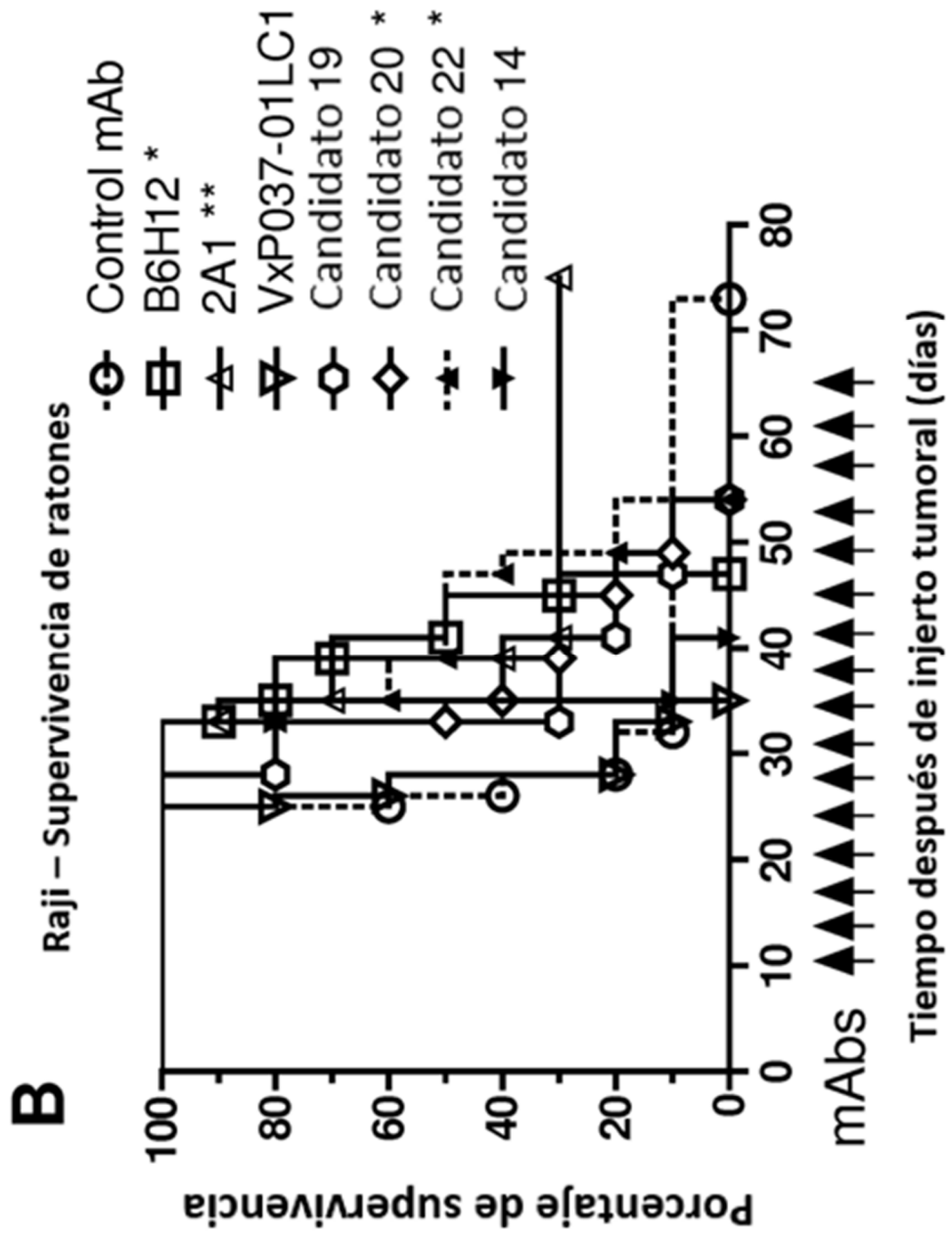

B
Raji – Supervivencia de ratones
Control mAb
B6H12 *
2A1 **
VxP037-01LC1
Candidato 19
Candidato 20 *
Candidato 22 *
Candidato 14
Porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
mAbs
0
10
20
30
40
50
60
70
80
Tiempo después de injerto tumoral (días)

Figura 10A

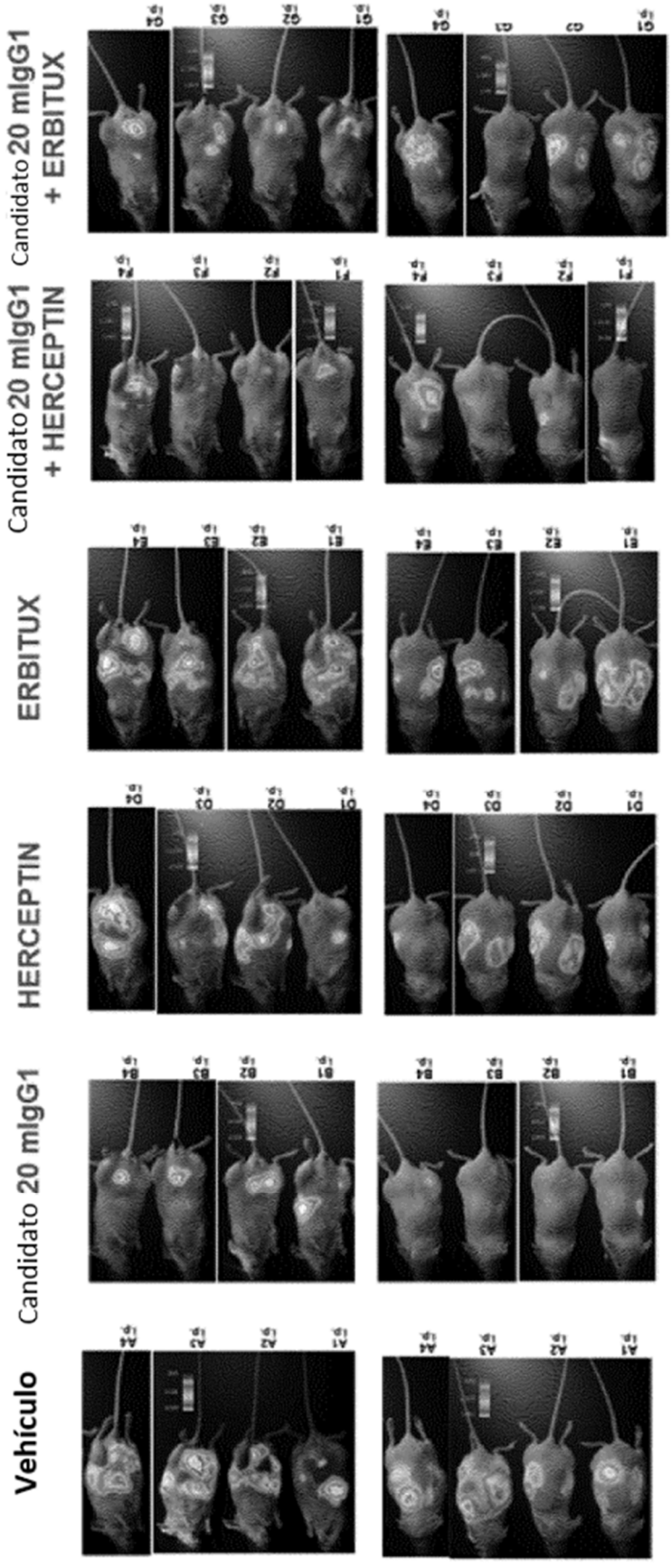

Vehículo
Candidato 20 mIgG1
HERCEPTIN
ERBITUX
Candidato 20 mIgG1 + HERCEPTIN
Candidato 20 mIgG1 + ERBITUX

Figura 10B

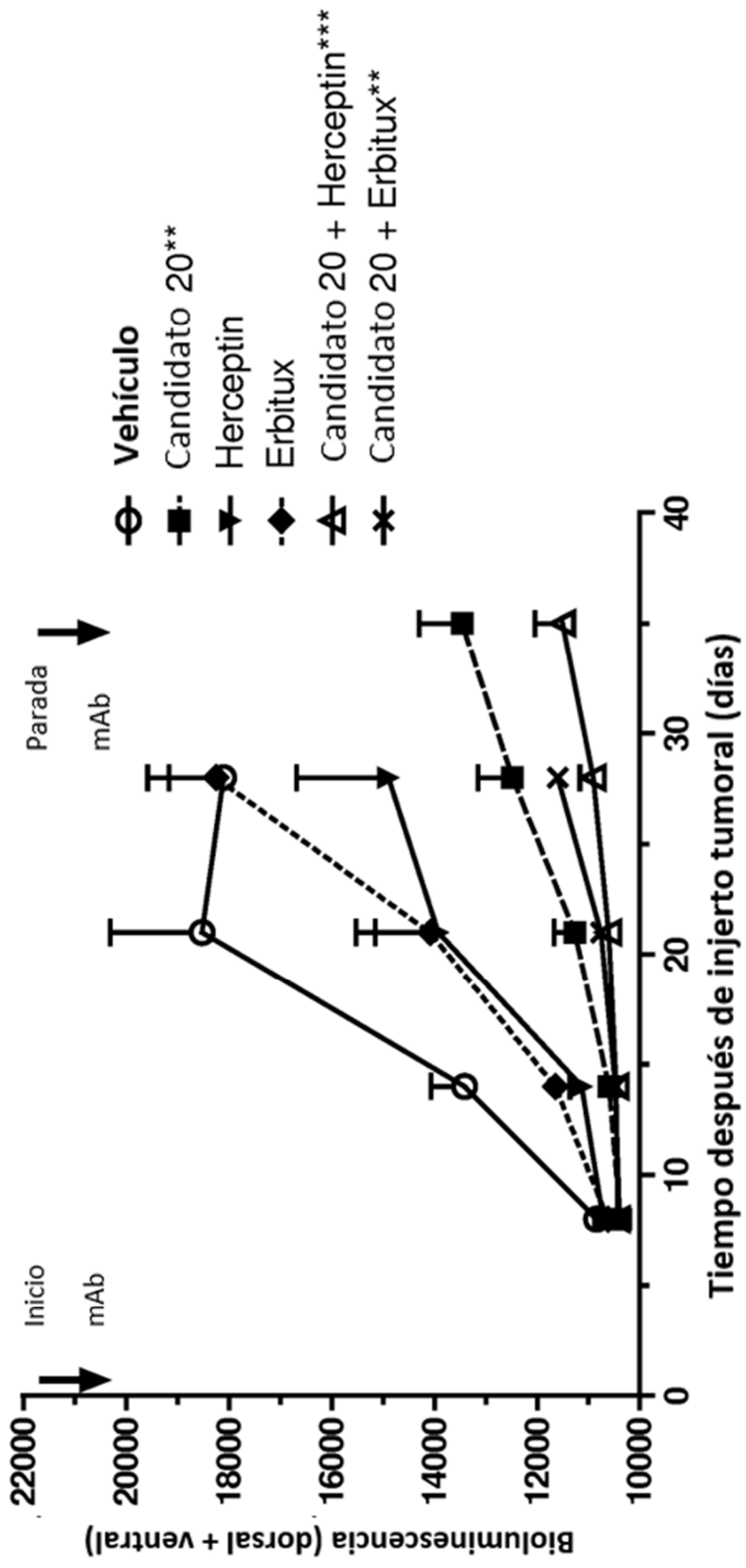

Crecimiento tumoral A2780
Inicio mAb
Parada mAb
Vehículo
Candidato 20**
Herceptin
Erbitux
Candidato 20 + Herceptin***
Candidato 20 + Erbitux**
Bioluminescencia (dorsal + ventral)
Tiempo después de injerto tumoral (días)
22000
20000
18000
16000
14000
12000
10000
0
10
20
30
40

Figura 11A

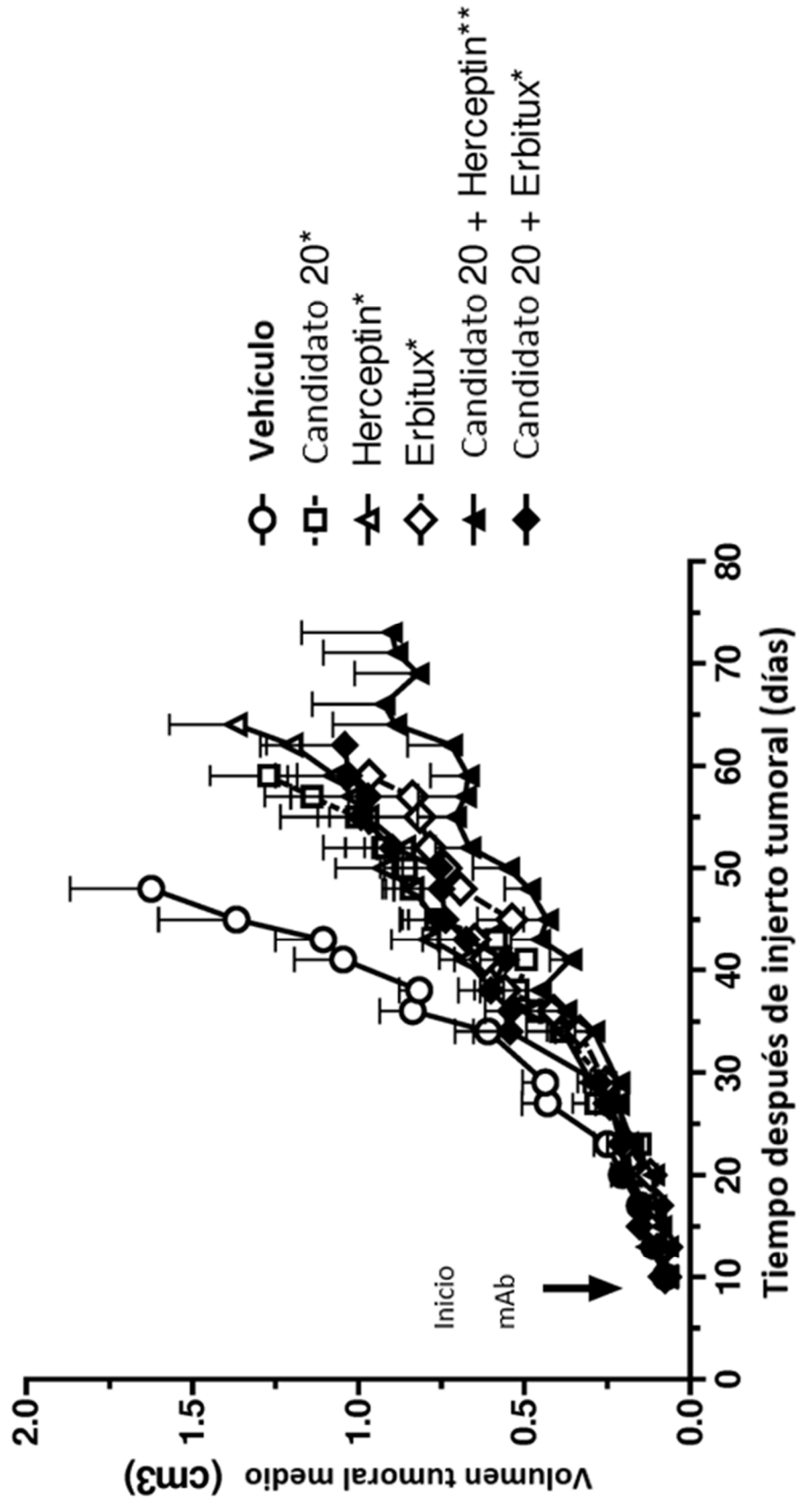

Crecimiento tumoral A549
Vehículo
Candidato 20*
Herceptin*
Erbitux*
Candidato 20 + Herceptin**
Candidato 20 + Erbitux*
Volumen tumoral medio (cm3)
Tiempo después de injerto tumoral (días)
Inicio
mAb
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
0
10
20
30
40
50
60
70
80

Figura 11B

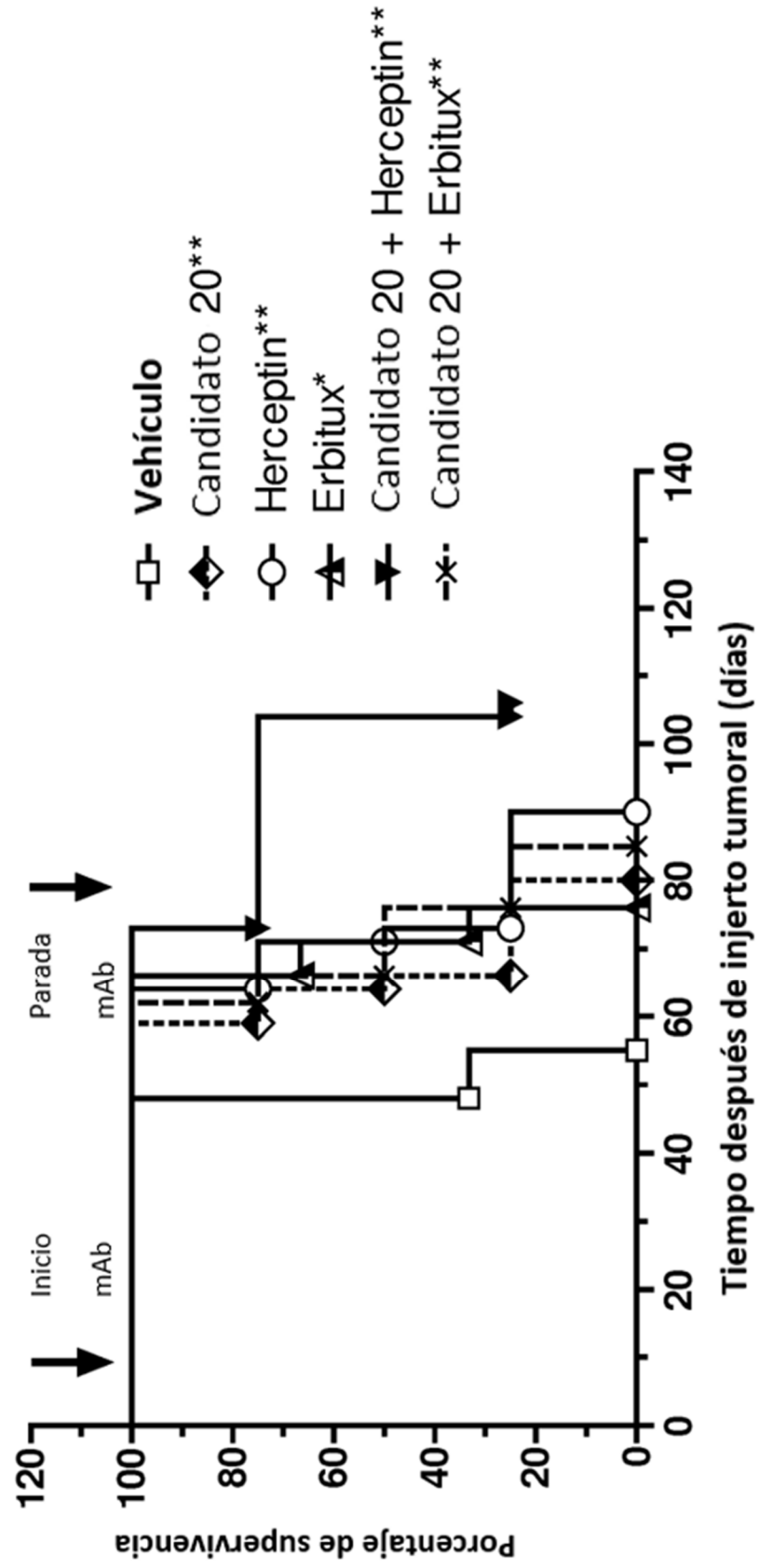

Tumor A549 – Supervivencia de ratones
Inicio mAb
Parada mAb
Vehículo
Candidato 20**
Herceptin**
Erbitux*
Candidato 20 + Herceptin**
Candidato 20 + Erbitux**
Porcentaje de supervivencia
Tiempo después de injerto tumoral (días)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
140

Figura 12A,B

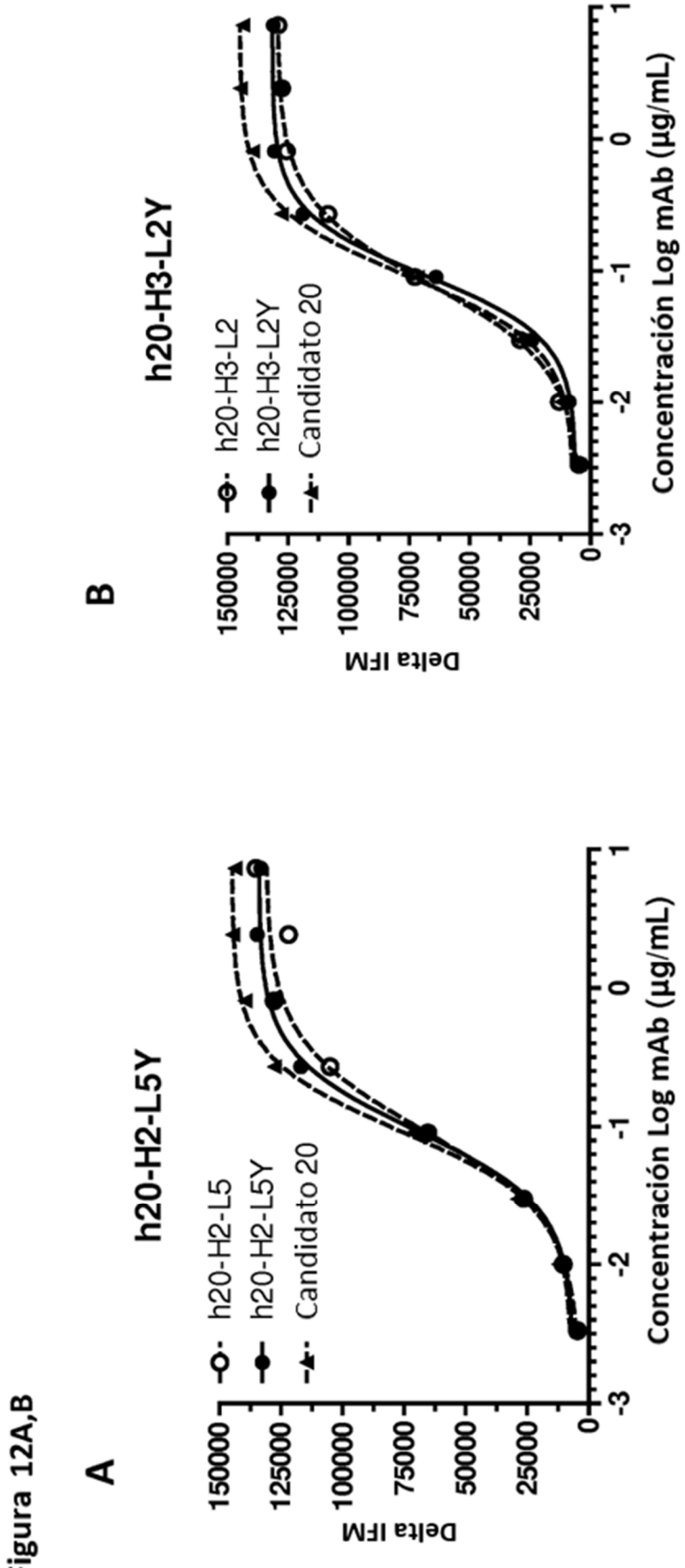

A
h20-H2-L5Y
h20-H2-L5
h20-H2-L5Y
Candidato 20
Delta IFM
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)
B
h20-H3-L2Y
h20-H3-L2
h20-H3-L2Y
Candidato 20
Delta IFM
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 12C,D

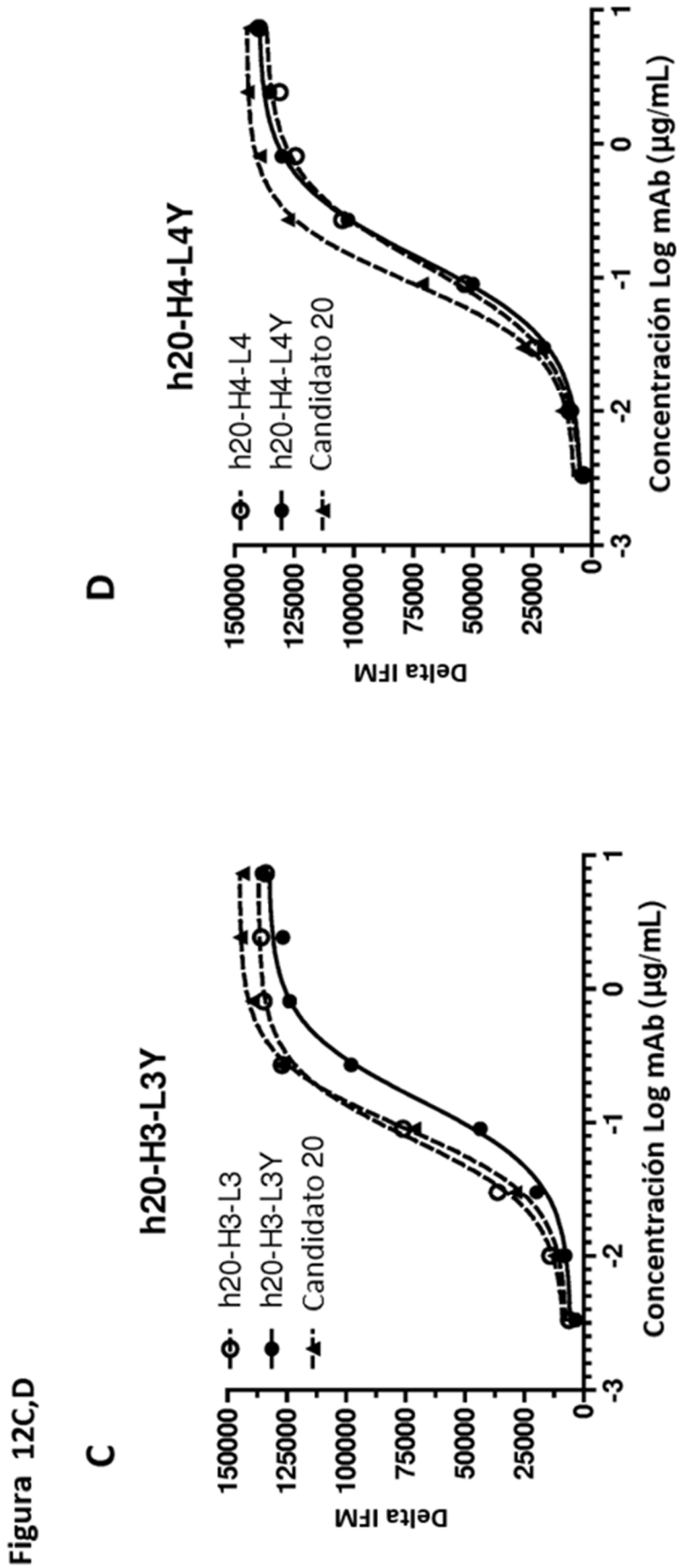

C
h20-H3-L3Y
h20-H3-L3
h20-H3-L3Y
Candidato 20
Delta IFM
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)
D
h20-H4-L4Y
h20-H4-L4
h20-H4-L4Y
Candidato 20
Delta IFM
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 12E

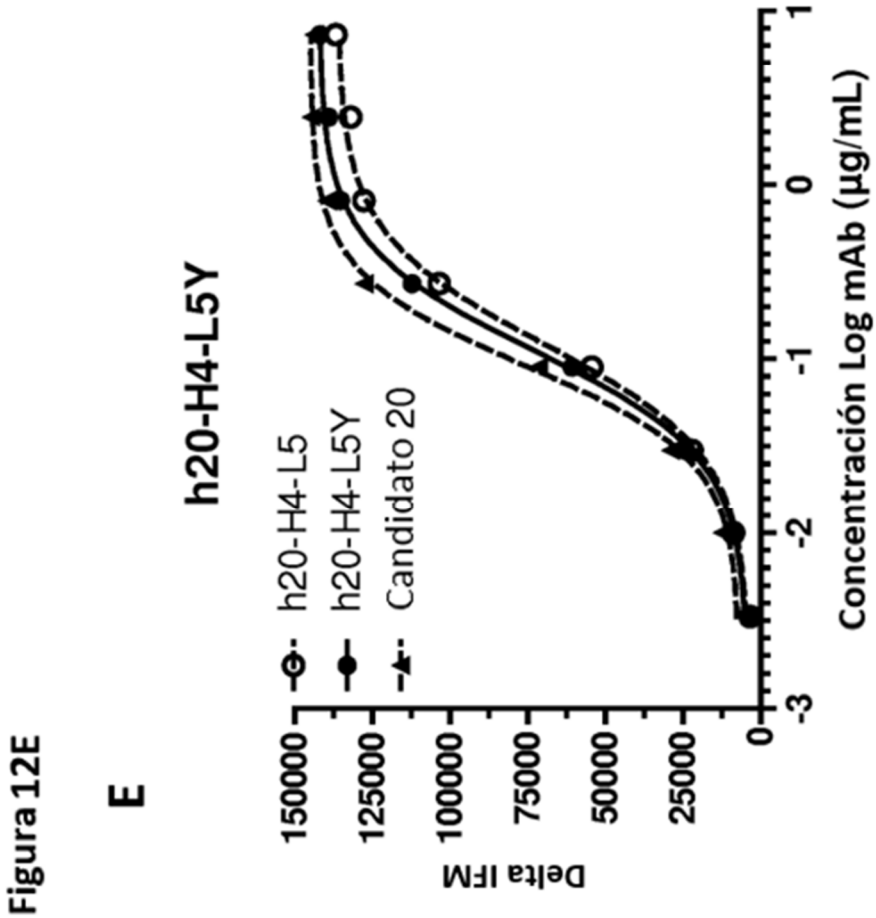

E
h20-H4-L5Y
h20-H4-L5
h20-H4-L5Y
Candidato 20
Delta IFM
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 13A,B

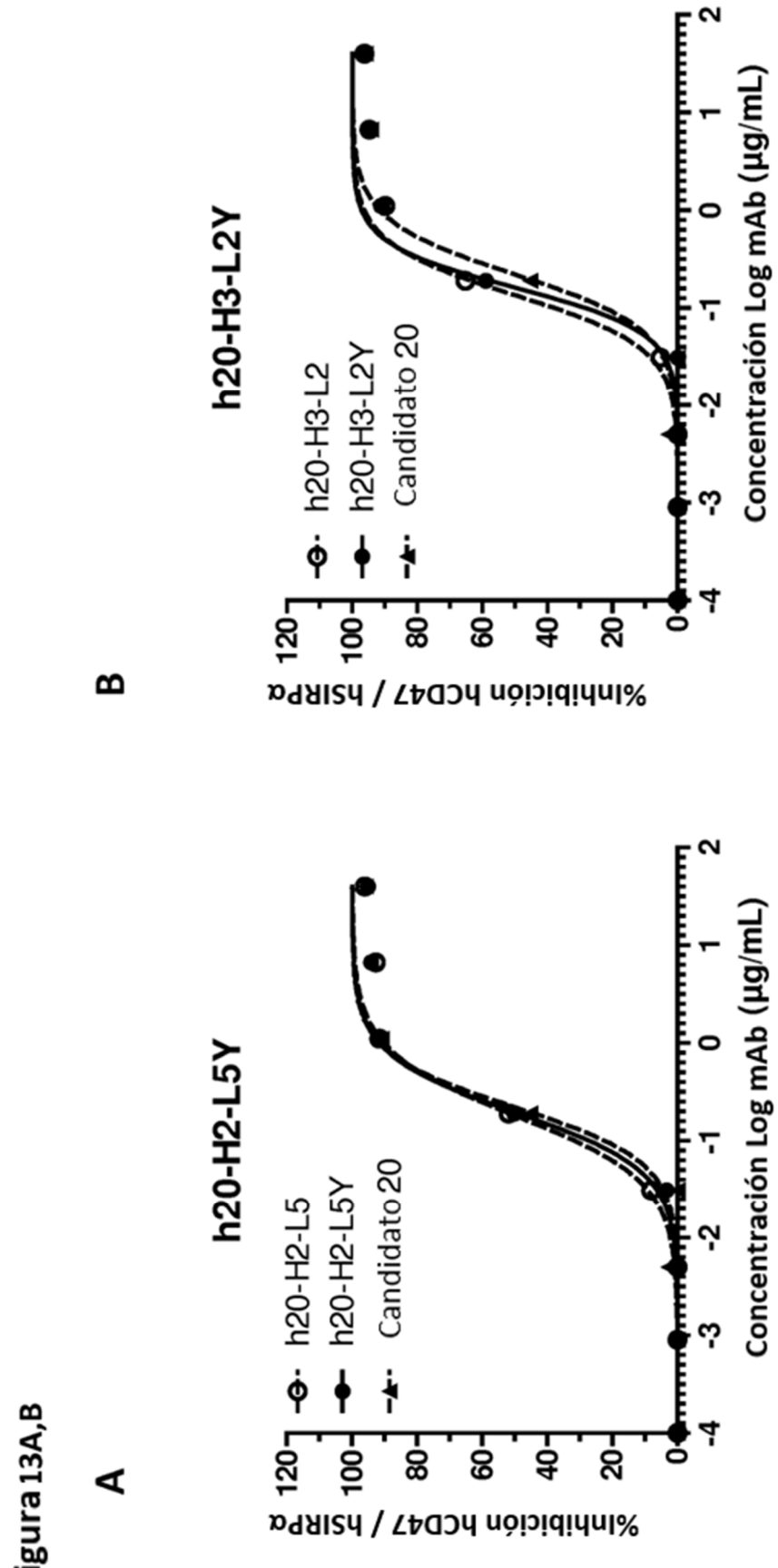

A
h20-H2-L5Y
h20-H2-L5
h20-H2-L5Y
Candidato 20
%Inhibición hCD47 / hSIRPα
Concentración Log mAb (µg/mL)
B
h20-H3-L2Y
h20-H3-L2
h20-H3-L2Y
Candidato 20
%Inhibición hCD47 / hSIRPα
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 13C,D

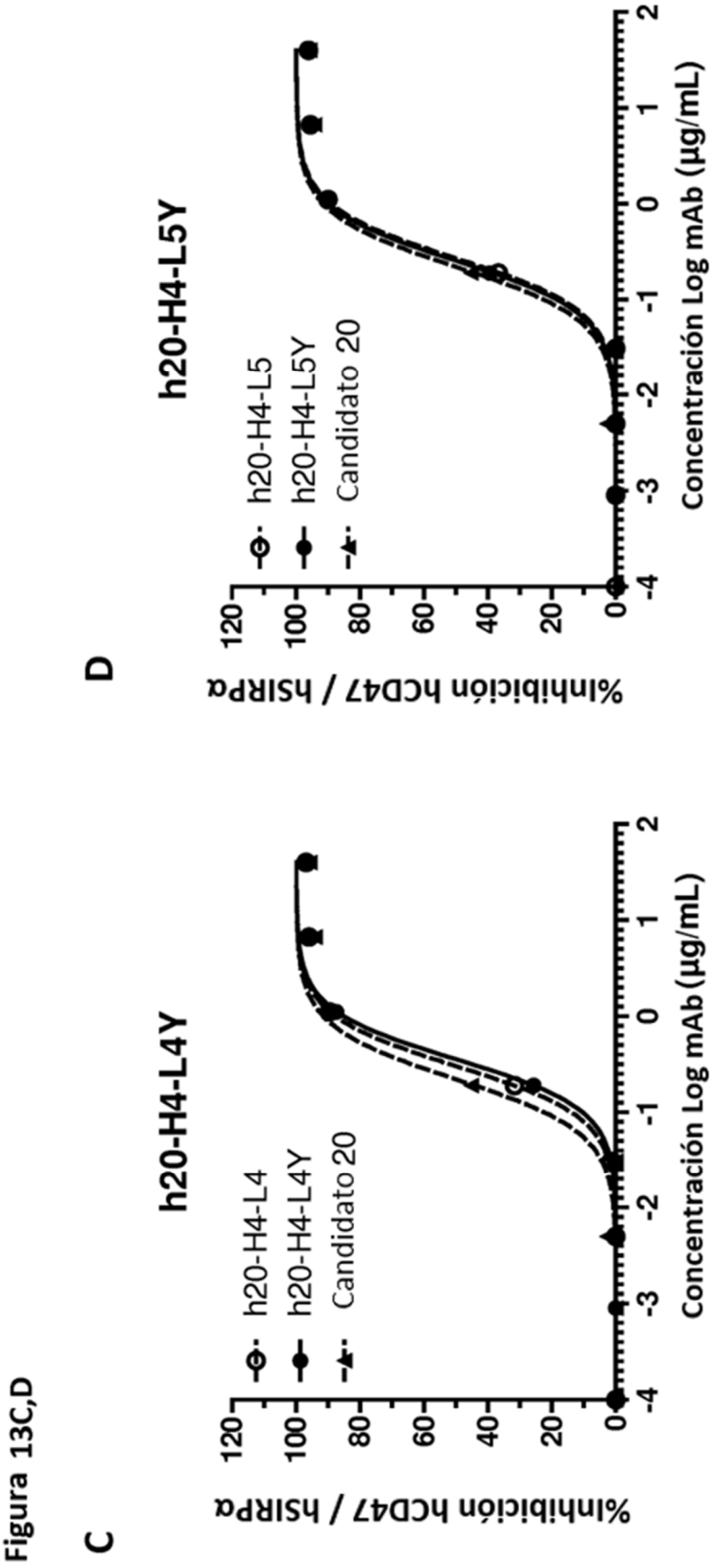

C
h20-H4-L4Y
h20-H4-L4
h20-H4-L4Y
Candidato 20
%Inhibición hCD47 / hSIRPα
Concentración Log mAb (µg/mL)
D
h20-H4-L5Y
h20-H4-L5
h20-H4-L5Y
Candidato 20
%Inhibición hCD47 / hSIRPα
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 13E

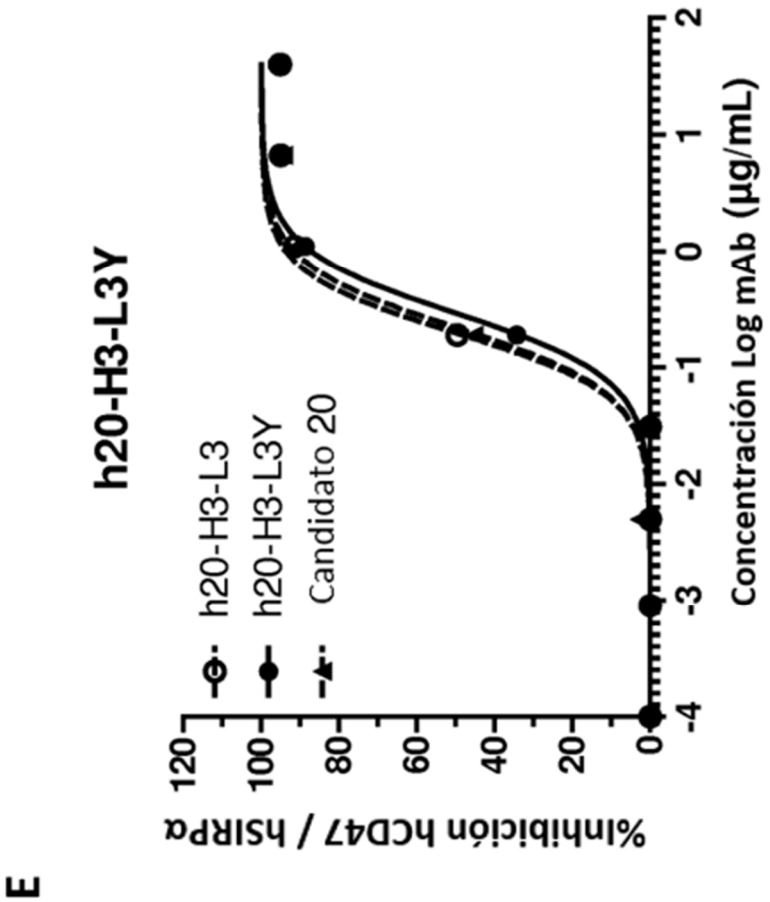

E
h20-H3-L3Y
h20-H3-L3
h20-H3-L3Y
Candidato 20
%Inhibición hCD47 / hSIRPα
120
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Concentración Log mAb (µg/mL)

Figura 14

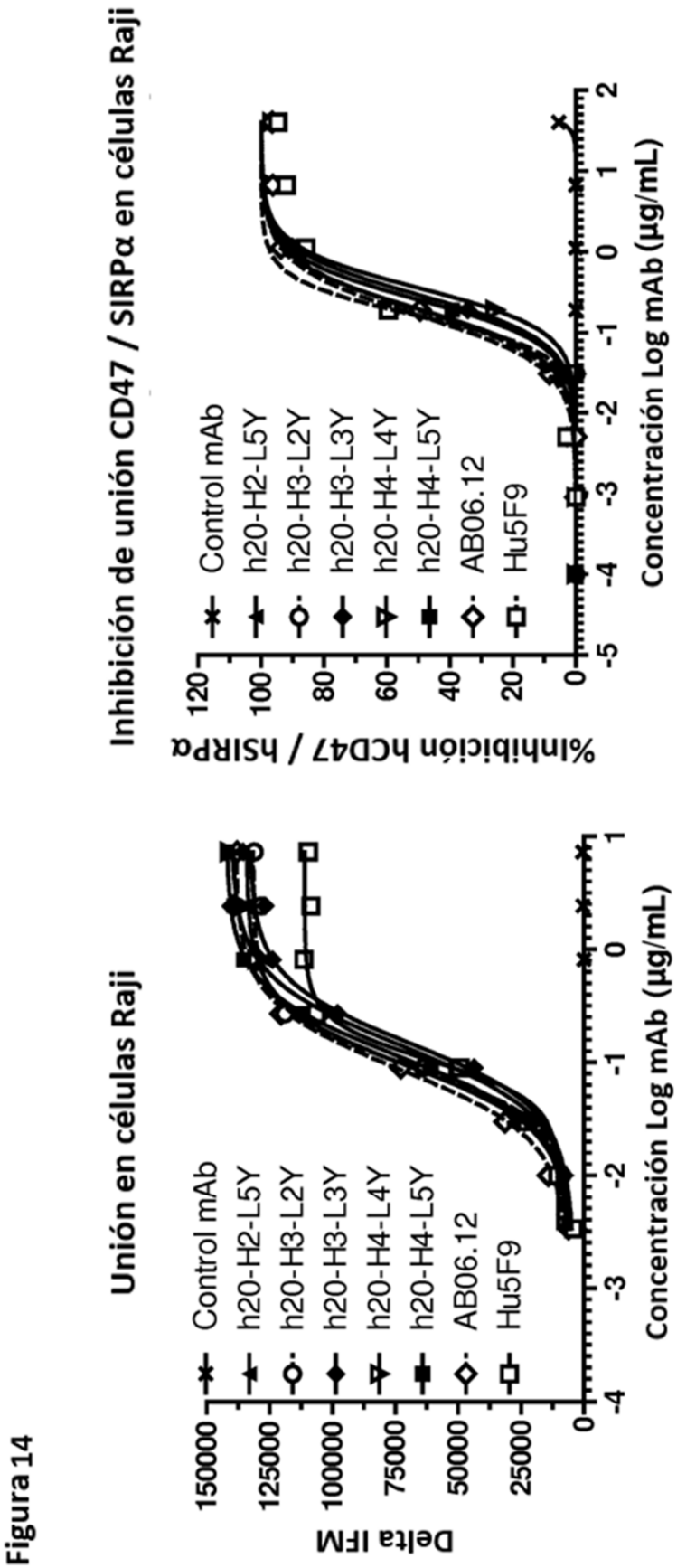
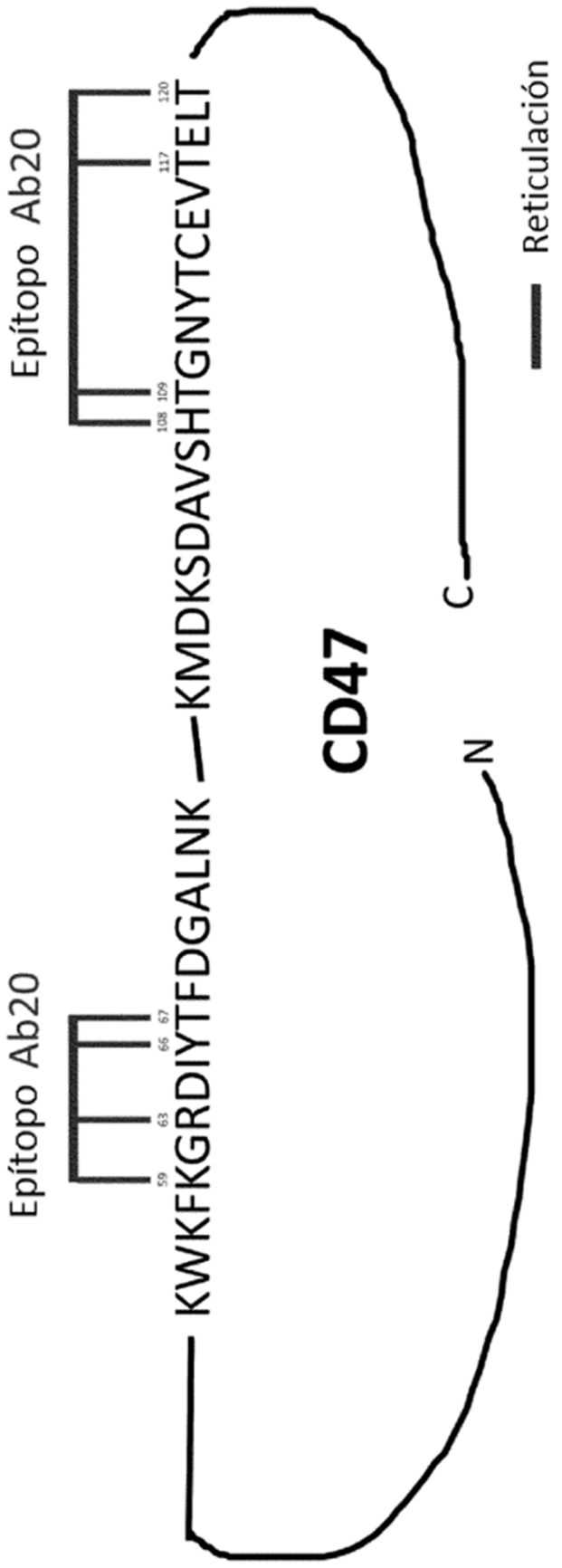

Unión en células Raji
Delta IFM
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-4
-3
-2
-1
0
1
Concentración Log mAb (µg/mL)
Control mAb
h20-H2-L5Y
h20-H3-L2Y
h20-H3-L3Y
h20-H4-L4Y
h20-H4-L5Y
AB06.12
Hu5F9
Inhibición de unión CD47 / SIRPα en células Raji
%Inhibición hCD47 / hSIRPα
120
100
80
60
40
20
0
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
Concentración Log mAb (µg/mL)
Control mAb
h20-H2-L5Y
h20-H3-L2Y
h20-H3-L3Y
h20-H4-L4Y
h20-H4-L5Y
AB06.12
Hu5F9

Figura 15


Epítopo Ab20
Epítopo Ab20
KWKFKGRDIYTFDGALNK
KMDKSDAVSHTGNYTCEVTELT
59
63
66
67
108
109
117
120
CD47
N
C
Reticulación

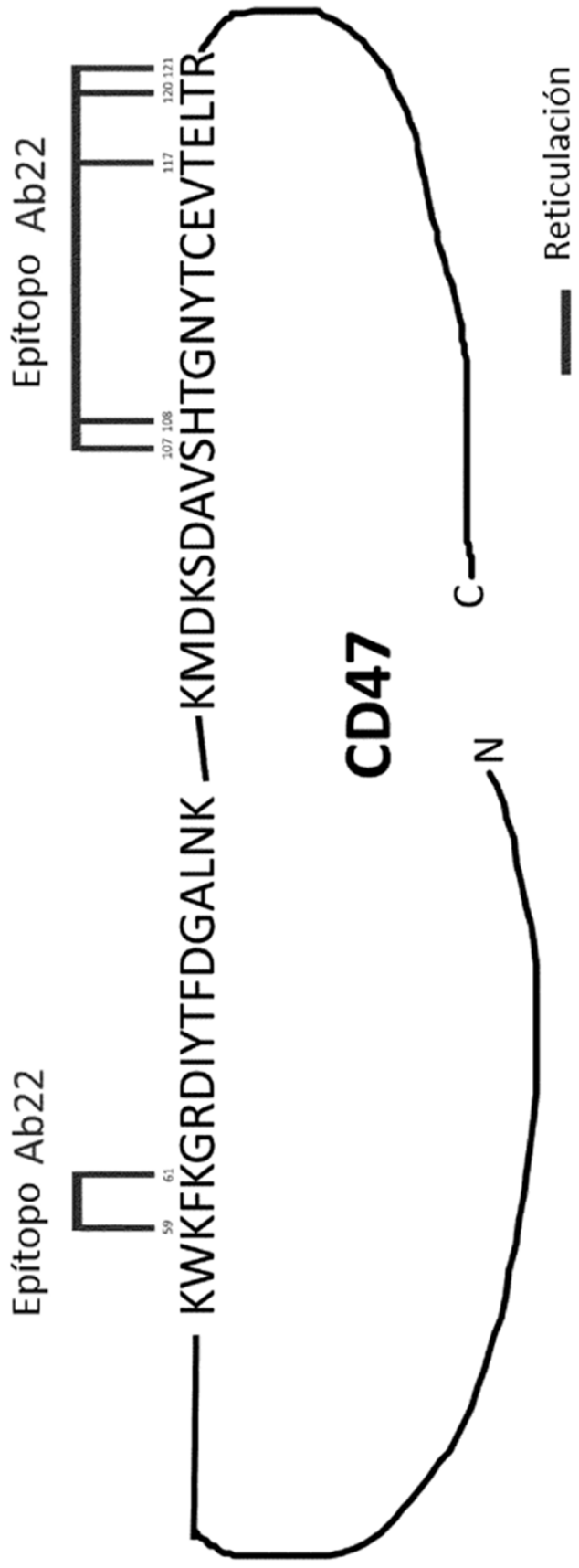

Epítopo Ab22
59 61
KWKFKGRDIYTFDGALNK
Epítopo Ab22
107 108
KMDKSDAVSHTGNYTCEVTELTR
117
120 121
CD47
N
C
Reticulación

Figura 16

Figura 17

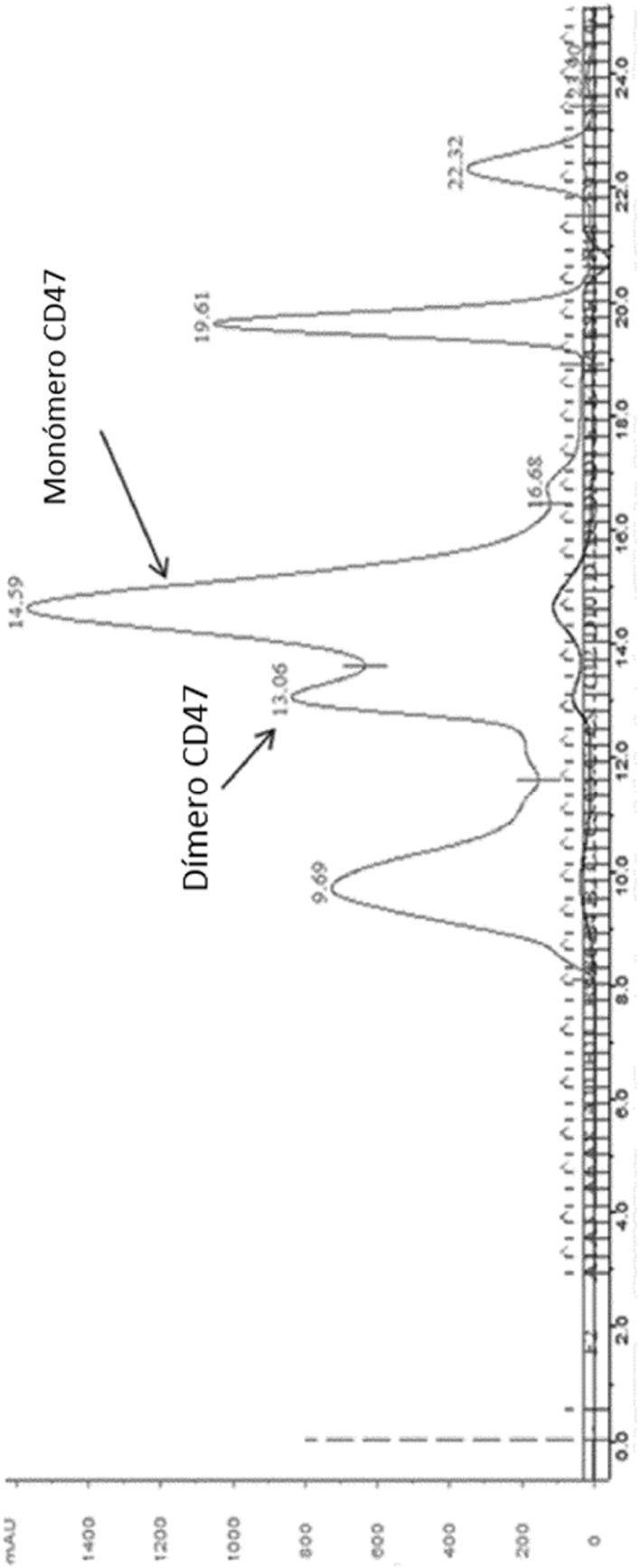

Monómero CD47
Dímero CD47
14.59
13.06
9.69
16.68
19.61
22.32
mAU
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.0
2.0
4.0
6.0
8.0
10.0
12.0
14.0
16.0
18.0
20.0
22.0
24.0

Figura 18

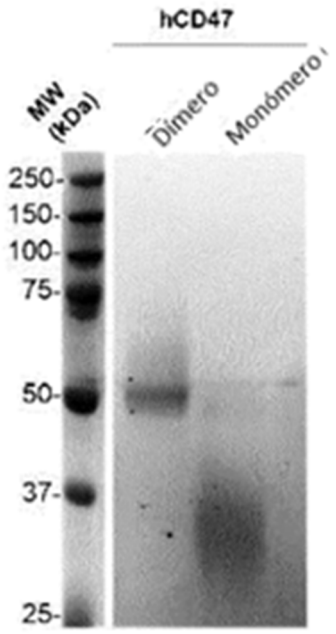


Figura 19

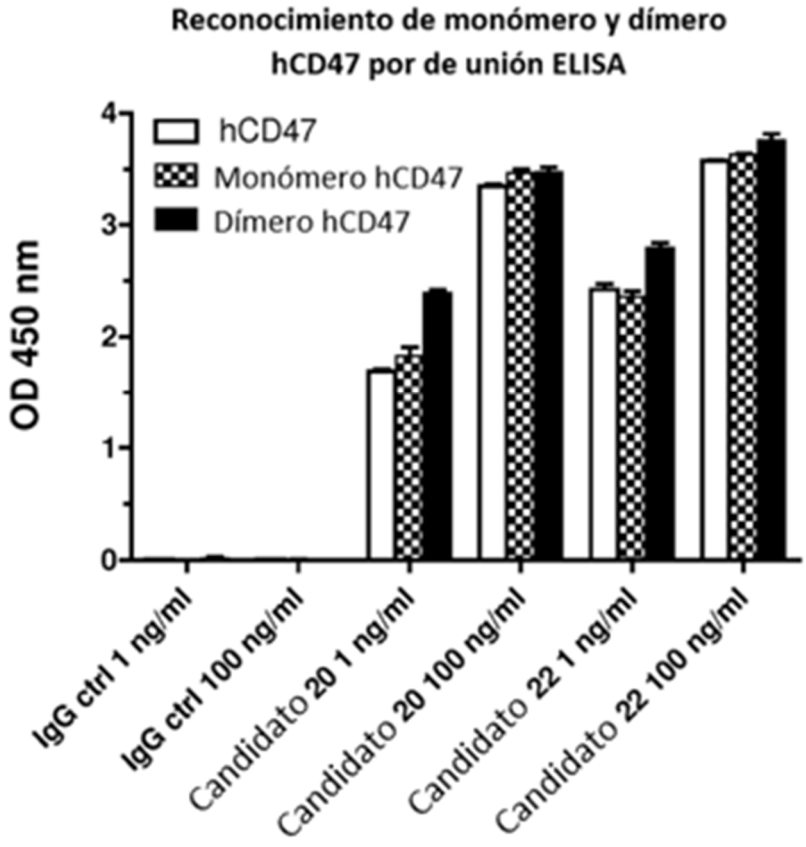


Figura 20

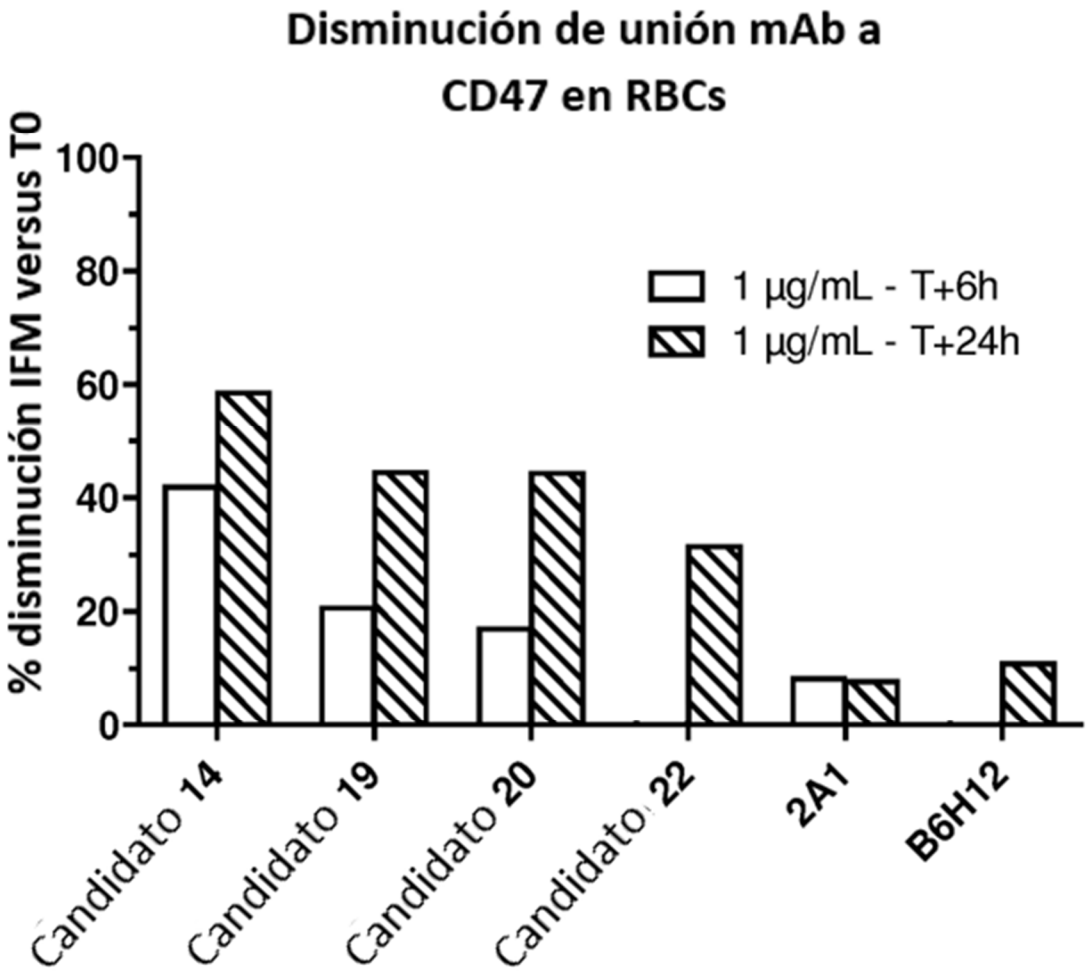

Disminución de unión mAb a CD47 en RBCs
% disminución IFM versus T0
100
80
60
40
20
0
1 µg/mL - T+6h
1 µg/mL - T+24h
Candidato 14
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
2A1
B6H12

Figura 21

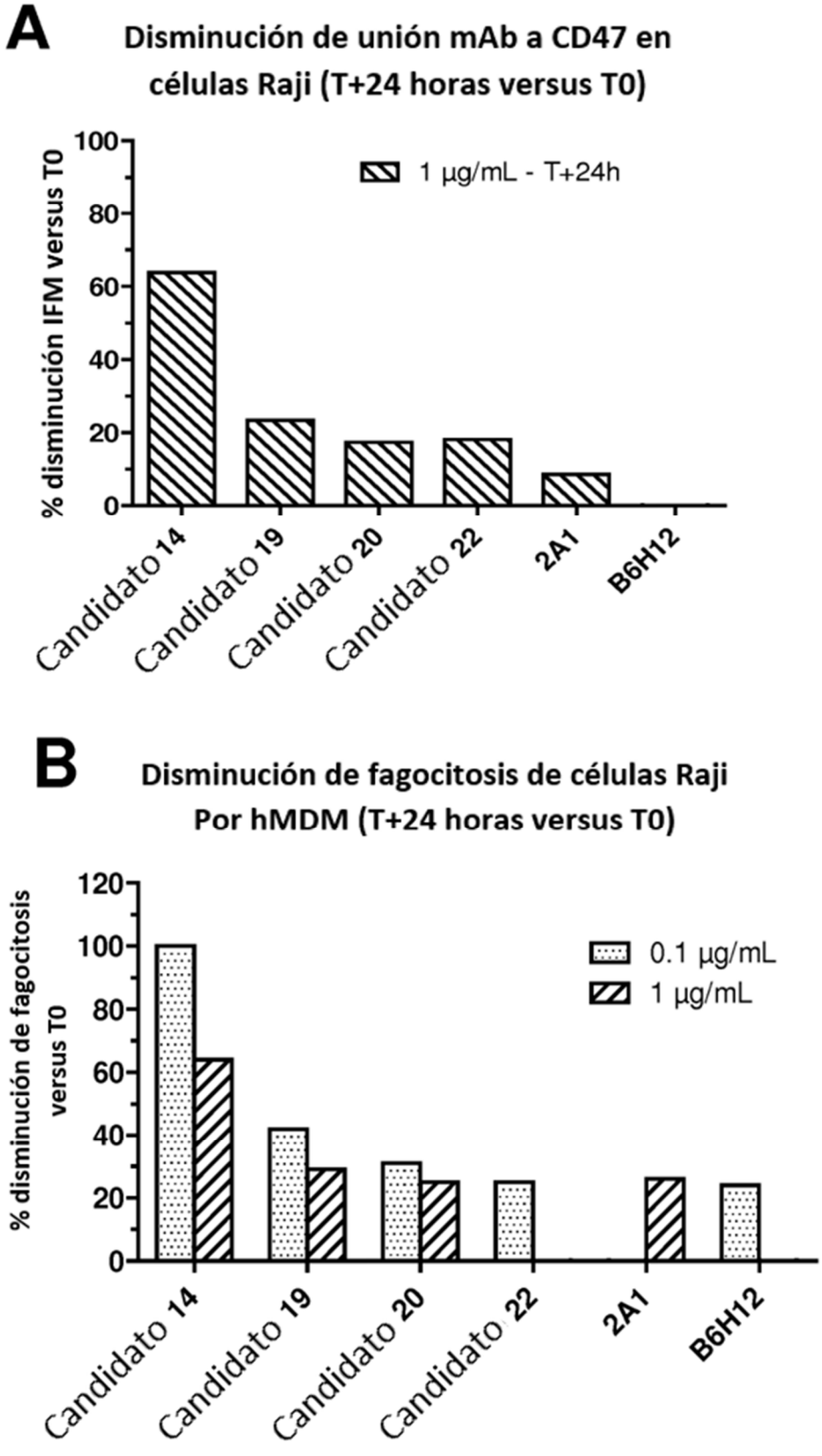
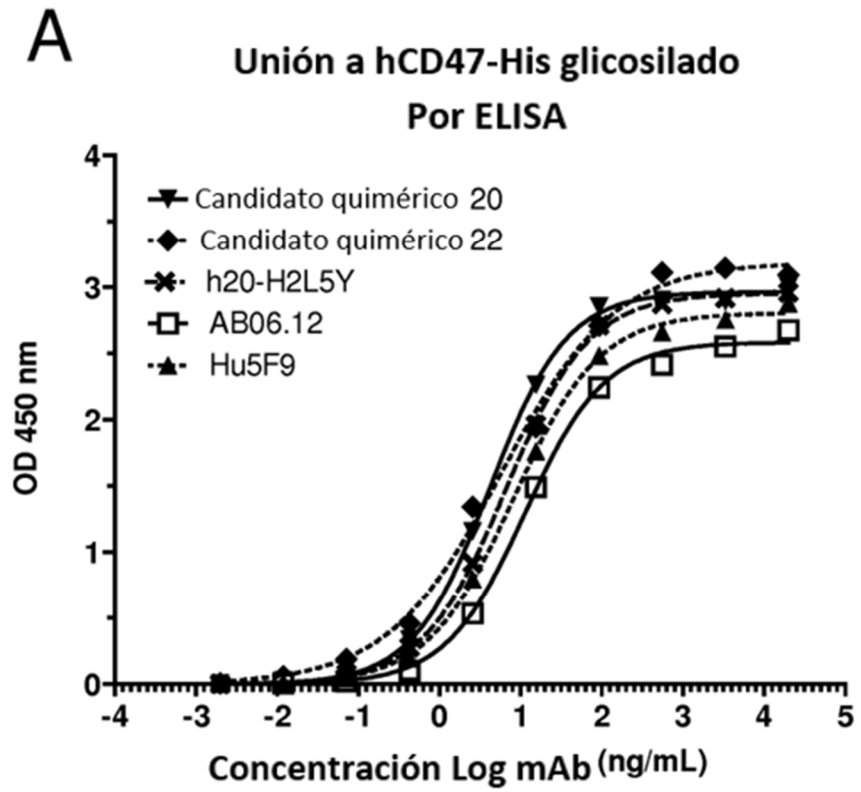

A
Disminución de unión mAb a CD47 en células Raji (T+24 horas versus T0)
% disminución IFM versus T0
100
80
60
40
20
0
1 µg/mL - T+24h
Candidato 14
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
2A1
B6H12
B
Disminución de fagocitosis de células Raji Por hMDM (T+24 horas versus T0)
% disminución de fagocitosis versus T0
120
100
80
60
40
20
0
0.1 µg/mL
1 µg/mL
Candidato 14
Candidato 19
Candidato 20
Candidato 22
2A1
B6H12

Figura 22


A
Unión a hCD47-His glicosilado
Por ELISA
Candidato quimérico 20
Candidato quimérico 22
h20-H2L5Y
AB06.12
Hu5F9
OD 450 nm
Concentración Log mAb (ng/mL)

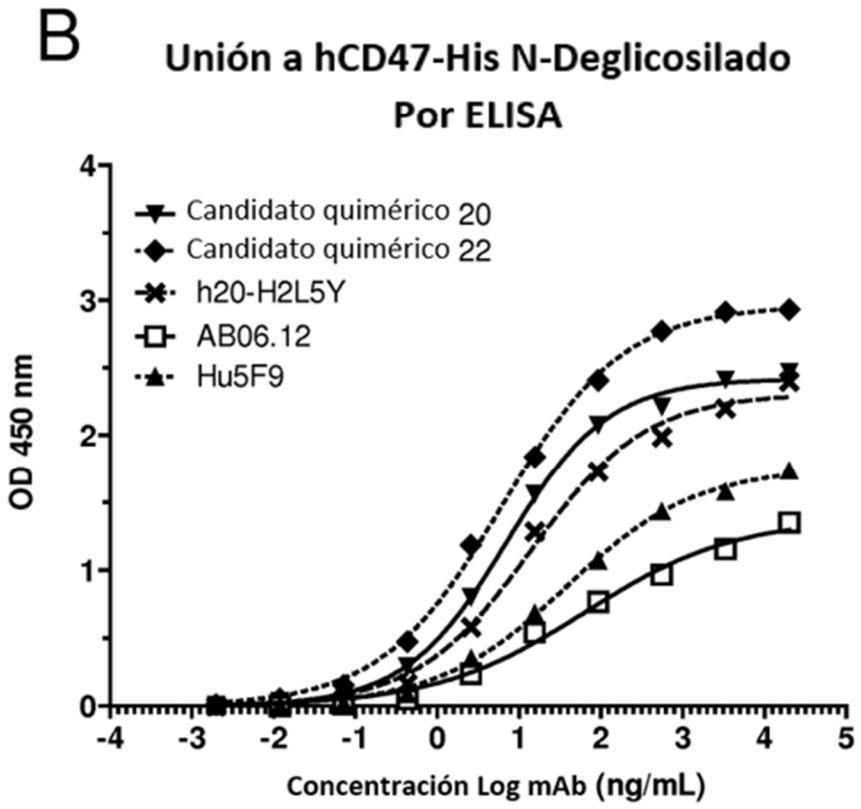

B
Unión a hCD47-His N-Deglicosilado
Por ELISA
Candidato quimérico 20
Candidato quimérico 22
h20-H2L5Y
AB06.12
Hu5F9
OD 450 nm
Concentración Log mAb (ng/mL)

Figura 23

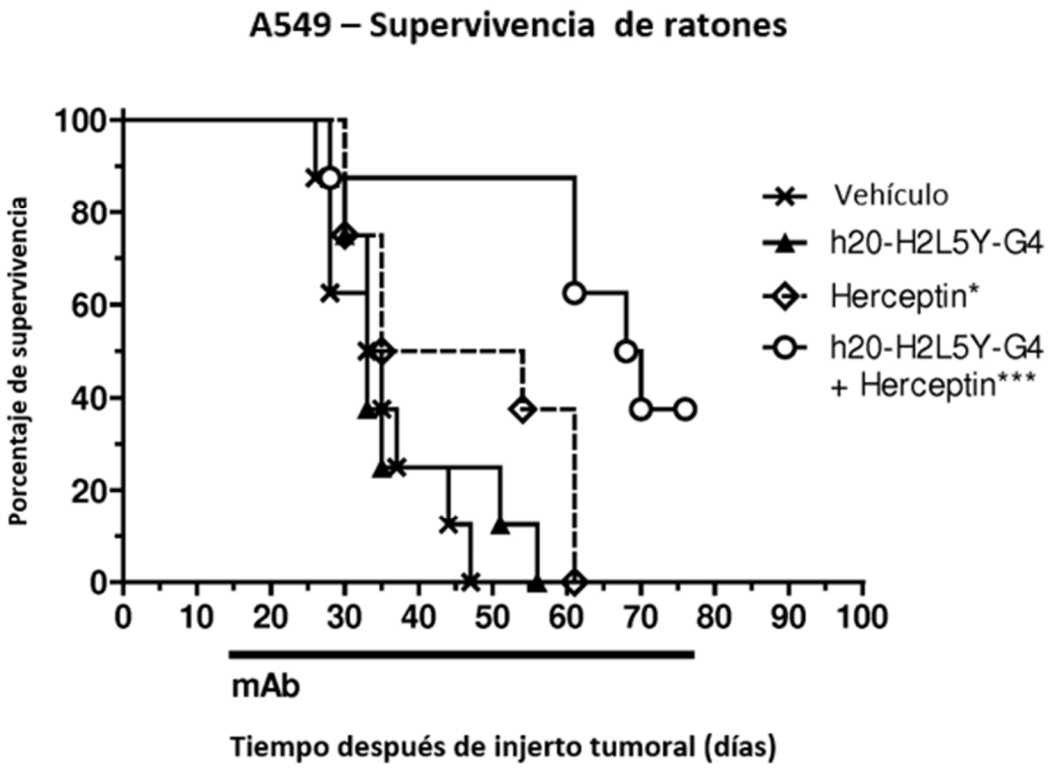
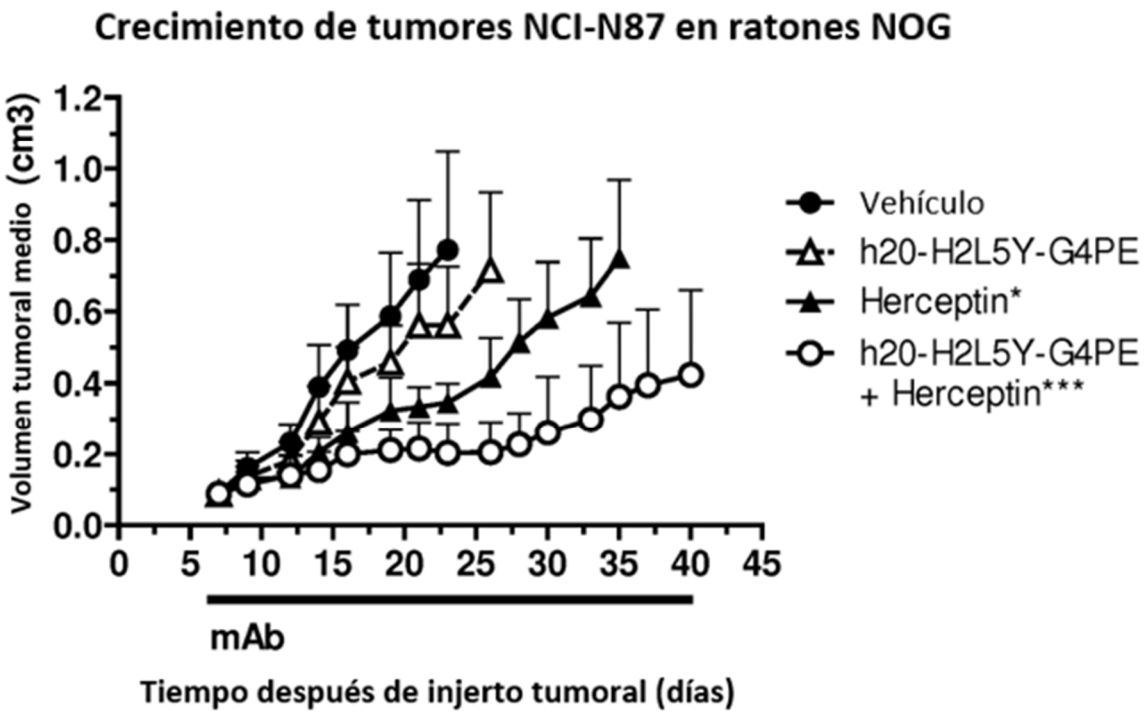

A549 – Supervivencia de ratones
Porcentaje de supervivencia
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
mAb
Tiempo después de injerto tumoral (días)
Vehículo
h20-H2L5Y-G4
Herceptin*
h20-H2L5Y-G4
+ Herceptin***

Figura 24


Crecimiento de tumores NCI-N87 en ratones NOG
Volumen tumoral medio (cm3)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
mAb
Tiempo después de injerto tumoral (días)
Vehículo
h20-H2L5Y-G4PE
Herceptin*
h20-H2L5Y-G4PE
+ Herceptin***